

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 24 606.8

Anmeldetag: 28. Mai 1999

Anmelder/Inhaber: Graffinity Pharmaceuticals AG, 69120 Heidelberg/DE

Erstanmelder: GRAFFINITY PHARMACEUTICAL
DISIGN GMBH, 69120 Heidelberg/DE

Bezeichnung: Ligand-Anker-Konjugate

IPC: C 07 C, C 07 K

Bemerkung: Die nachgereichte Seite 93 mit den Patentansprüchen 17 bis 22 ist am 31. August 1999 eingegangen.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 3. März 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schäfer

A 9161
06/00
EDV-L

BEST AVAILABLE COPY

Graffinity Pharmaceutical Design GmbH

u.Z.: D 1749 DE

Ligand-Anker-Konjugate

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Ankermoleküle, sowie Ligand-Anker-Konjugate, die zur Bereitstellung von Meßoberflächen zur Detektion molekularer Interaktionen zwischen immobilisierten Liganden und nicht immobilisierten Interaktionspartnern (Rezeptoren) dienen. Weiterhin betrifft die Erfindung spezifische
10 Syntheseverfahren in der Herstellung erfindungsgemäßer Ligand-Anker-Konjugate (LAK).

Die Modifizierung organischer oder anorganischer Oberflächen kann nicht nur zur Aufreinigung von Biomolekülen (z.B. die Adsorption von Nukleinsäuren an Träger,
15 wie von Qiagen, Hilden, Deutschland in WO 95/01359 offenbart, oder die Vernetzung einer Dextranpolymermatrix für die Affinitätschromatographie oder Gelfiltration, Sephadex® von Pharmacia, Uppsala, Schweden) eingesetzt werden, sondern auch für die biomolekulare Interaktionsanalyse.

20 Biomolekulare Interaktionen werden in bekannten Verfahren der Interaktionsanalyse an Rezeptor-Ligandsystemen studiert, wobei der Rezeptor gewöhnlich ein Biomakromolekül (z.B. ein Protein oder eine Einzelstrang-DNA) ist und der Ligand eine "Sonde", ein Molekül meist geringeren Molekulargewichts biologischer oder synthetischer Herkunft darstellt (Peptide, Oligonukleotide oder sog. kleine
25 organische Moleküle). Solche Liganden weisen hochspezifische Strukturmerkmale auf, die bei Vorliegen korrespondierender Strukturen am Rezeptor mit diesem in Wechselwirkung treten können. Die Anbindung an den Rezeptor kann durch einen oder mehrere Liganden erfolgen. Die Interaktionsanalyse wird in der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie zur Wirkstoffsuche eingesetzt. Hierbei gilt es, eine möglichst
30 große Anzahl an verschiedenen Proben in möglichst kurzem Zeitraum zu analysieren (High-Throughput Screening, HTS). Weiterhin findet die Interaktionsanalyse für das

Genomstudium (Polymorphismen- (SNP) oder Expressionsmusteranalyse) oder auch für die Lebensmittelanalytik Verwendung.

Es ist von praktischem Vorteil, einen der Bindungspartner, Rezeptor oder
5 Liganden, kovalent oder durch Adsorption an eine organische oder anorganische
Oberfläche zu binden. Durch diese Generierung einer spezifischen Grenzschicht auf der
Oberfläche (Immobilisierung von Liganden oder Rezeptor) erhält diese eine
Bioaktivität. Die Immobilisierung eines Bindungspartners erleichtert die Prozeßführung,
wie z.B. das Durchführen von Waschschritten und vermag in Verbindung mit einem
10 geeigneten, meist optischen Detektionsverfahren (z.B. Fluoreszenzmessung) Auskunft
über das Vorhandensein und die Stärke der Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und
Ligand auf molekularer Ebene zu geben.

Bioaktive Oberflächen lassen sich üblicherweise in mehreren Schritten erzeugen.
15 Besondere Vorteile (physikochemische Stabilität, strukturelle Einheitlichkeit) bieten
Filme aus organischen Monolagen (Bain und Whitesides, Angew. Chem. 101 (1989)
522-8; Zhong und Porter, Anal. Chem. (1995) 709A-715A). Hierbei werden in einem
ersten Schritt Thiole auf Gold chemisorbiert. Langkettige Alkylthiole packen sich als
hochgeordnete Monoschicht (self assembled monolayer, SAM) auf die Festphase, wobei
20 die Goldatome von den Schwefelfunktionen komplexiert werden. Solche SAMs sind aus
der Literatur vorbekannt und mit vielerlei physikalischen Methoden gut charakterisiert
worden. In Poirier und Pylant, Science, 272 (1996) 1145-8 finden sich "scanning
tunnel"-mikroskopische Aufnahmen solcher Monolagen auf Gold.

25 Sind die SAM-Alkanketten endständig mit beispielsweise einer Hydroxygruppe
versehen ("omega-funktionalisiert"), so lassen sich in nachfolgenden Reaktionen sog.
hydrophile Spacer (z.B. Dextran) anknüpfen. Das Dextran wirkt als
proteinadsorptionsresistentes Hydrogel und vermindert die unspezifische Bindung
(passive Adsorption) der zu untersuchenden Biomoleküle. Die Modifikation
30 (Carboxymethylierung) oder Oxidation des Dextrans führt zu statistisch verteilten
Carboxyfunktionen, welche sich für Biokonjugationsreaktionen eignen; die Carboxylate
werden anschließend durch Ausbildung sog. Aktivester chemisch aktiviert. In einem

zweiten Schritt der auch als „Konjugationsschritt“ bezeichnet wird, werden diese Aktivester mit einem eine primäre Aminofunktion enthaltenden Liganden oder Rezeptor kovalent verknüpft (Biacore®-Verfahren). Durch diesen letzten Schritt wird anschließend eine synthetische, bioaktive Oberfläche erhalten. Oberflächen, bei denen
 5 die Aktivierungs- und Konjugationsschritte nicht durchgeführt werden oder bei denen Konjugate erzeugt werden, von denen erwartet werden kann, daß sie keine Bioaktivität zeigen durch Verknüpfung mit sogenannten „Nichtliganden“, dienen üblicherweise als wichtige sog. negative Kontrollen in den Bindungsstudien. Als Nichtliganden werden dabei gewöhnlich sehr kleine organischen Gruppen, z.B. Acetyl-, Methyl- oder
 10 Aminoethylreste aufgebracht.

Andere Verfahren zur Generierung bioaktiver Oberflächen nutzen folgende molekulare Schichtaufbauten:

- Silanisierung von Glas oder Silizium mit reaktiven Epoxid- oder Aminogruppen-
 15 haltigen Silanen, anschließende Acylierung der Aminogruppen, beispielsweise mit Nukleosidderivaten (Maskos und Southern, Nucl. Acids Res. 20 (1992) 1679-84).
- Passive Adsorption von Polylysin auf Glas, anschließende Deponierung von DNA durch nicht-kovalent elektrostatische Bindung (Schena et al., Science, 270 (1995) 467-70).
- 20 • Passive Adsorption von Protein auf Polystyrol (allgemein gebräuchliche ELISA-Technik).
- Passive Adsorption von Vesikeln oder Micellen an SAMs oder hydrophoben Silanschichten (Sackmann, Science, 271 (1996) 43-47).
- Passive Adsorption von gespritzten Lipiden auf Glas (Langmuir-Blodgett Technik).
- 25 • Passive Adsorption von Proteinen oder Peptiden auf Nitrocellulose oder anderen Membranmaterialien (allgemein gebräuchliche "dot blot" Technik).

Auf Grundlage dieser Methoden können relativ komplexe Mehrlagensysteme realisiert werden, z.B. kann ein Aminopolysiloxan auf Glas oder ein SAM auf Gold
 30 biotinyliert werden, darauf läßt sich eine Avidinschicht aufziehen, welche wiederum biotinylierte Liganden oder Rezeptoren zu binden vermag (Müller et al., Science, 262 (1993) 1706-8). Ein anderes Beispiel ist die sog. "His-tag" oder Nickel-NTA-

Oberfläche, welche durch Metallkomplexierung Liganden oder Rezeptoren bindet, die ein Histidin-Oligomermotiv tragen.

Alle oben beschriebenen Verfahren bergen den enormen Nachteil in sich, die
5 bioaktive Komponente (Rezeptor od. Ligand) erst in einem abschließenden, späten
Schritt innerhalb eines mehrstufigen Oberflächenmodifikationsprozesses
einzubringen. Dadurch entsteht auf der Oberfläche ein schlecht charakterisierbarer,
komplexer Aufbau, dessen Eigenschaften wie Belegungsdichte und Konstitution schwer
zu erfassen sind. Ein großes Problem bei der Gestaltung bioaktiver Oberflächen liegt
10 darin, genaue Kenntnis über die molekularen Bestandteile der Oberflächen zu
erlangen. Ohne diese Information können gefundene Aktivitäten nur schlecht mit den
dafür verantwortlichen chemischen oder biologischen Strukturen korreliert werden. Die
detaillierte chemische Analyse von in mehrstufigen Verfahren modifizierten Oberflächen
ist aufgrund der naturgemäß sehr geringen Substanzmengen äußerst schwierig. Bislang
15 konnte nur gezeigt werden, daß die Anwesenheit von an die bioaktive Oberfläche nicht-
kovalent gebundenen Rezeptoren mittels Laserdesorptionsmassenspektrometrie
nachweisbar ist (Nelson et al., Anal. Chem., 69 (1997) 4363-8). Zum vergleichenden
Studium von Bindungsphänomenen an bioaktiven Grenzschichten ist eine genaue
Kenntnis der diese Schicht konstituierenden chemischen Substanzen unumgänglich, da
20 bekannt ist, daß schon kleine strukturelle Unterschiede drastische Effekte auf die
molekulare Wechselwirkung haben können. Die derzeit für die direkte
physikochemische Charakterisierung von Monolagen zur Verfügung stehenden
Techniken (z.B. XPS, FT-IR) sind nicht in der Lage, zur detaillierten Strukturaufklärung
beizutragen. Der nicht-destruktiven Desorption und Analyse mit hochauflösenden
25 Verfahren, wie MS, steht die hohe Beständigkeit der SAM- oder Silan-Filme entgegen.

Die derzeit bestcharakterisierten bioaktiven Schichten werden, wie vorstehend
ausgeführt erhalten, indem gelöste Alkanthiole mit einer Goldoberfläche kontaktiert
werden. Die dabei gewonnenen selbst assemblierten Monoschichten (SAM) sind mit
30 zahlreichen physikalischen Meßmethoden eingehend charakterisiert worden, und das
Verständnis der strukturellen Eigenschaften dieser Oberflächen ist hoch. Das
Aufbringen makromolekularer Schichten auf eine SAM, wie sie im Biacore®-Verfahren

angewendet werden, macht diesen Vorteil jedoch wieder zunichte. Die Knüpfung neuer chemischer Bindungen an einer heterogenen, strukturell uneinheitlichen Dextranmatrix erfolgt gewissermaßen "blind" und kann nur durch indirekte Meßverfahren überprüft werden. Dies ist nicht nur für die Optimierung der Reaktionsparameter ungünstig, sondern auch unter dem Gesichtspunkt der Immobilisierung einer sehr großen Probenvielfalt von großem erheblichen Nachteil. Von einer "Kontrolle" der Oberflächenstrukturen auf molekularem Niveau kann hierbei nicht ausgegangen werden.

Bei dem vorgenannten Biacore® System (Biacore AB, Uppsala, Schweden) wird die bioaktive Oberfläche in Form eines Meßchips verwendet, der eine dünne Goldoberfläche mit einer darauf immobilisierten Einzelschicht (Monolage) organischer Moleküle enthält, an die wiederum eine organische Matrix, insbesondere eine Dextranmatrix, gekoppelt ist. Dieser Aufbau wird in WO 90/05303 beschrieben. Der Meßchip wird in der Regel in das Meßgerät eingelegt und anschließend „aktiviert“, d.h. in die Matrix werden chemisch reaktive Gruppen eingefügt, die eine weitere Funktionalisierung der Oberfläche mit Hilfe von Liganden ermöglichen. Diese zu immobilisierenden Liganden werden anschließend mit der Oberfläche in Kontakt gebracht, was zu ihrer kovalenten Bindung an die Matrix führt. Dann werden überschüssige reaktive Gruppen mit einer anderen, meist niedermolekularen, Substanz abgesättigt, die nicht zur Interaktion mit den Testsubstanzen fähig sind. Erst jetzt ist der Meßchip prinzipiell für die Detektion von Substanzen, die mit dem auf der Oberfläche immobilisierten Liganden interagieren, vorbereitet. Die eigentliche Messung erfolgt dabei mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR).

Nachteilig bei diesem Verfahren ist jedoch die Tatsache, daß die Meßoberfläche, d.h. die Bindematrix, zunächst wie oben erläutert in einem oder mehreren Schritten aktiviert bzw. vorbereitet werden muß, wobei diese Schritte in einem Flußsystem innerhalb des Meßgerätes vorgenommen werden. Ferner bildet die verzweigte organische Matrix eine gelartige Schicht über der Goldoberfläche und enthält nach der Vorbereitung der Bindematrix und der Immobilisierung die Liganden in statistischer Verteilung nicht nur an der Oberfläche der Matrix sondern auch in ihrem Inneren. Die Reaktionsbedingungen lassen sich während der Bereitstellung der Meßoberfläche nicht

derart steuern, daß eine genau definierte Oberflächenstruktur gebildet wird. Somit werden häufig Diffusionseffekte des Analyten in die stark hydratisierte organische Matrix relevant, so daß eine Diffusionslimitierung der Interaktion zwischen Analyt und immobilisiertem Liganden vorliegen kann. In solchen Fällen können keine verlässlichen Aussagen mehr über kinetische bzw. thermodynamische Konstanten der Interaktion mehr getroffen werden. In der Vergangenheit haben Schuck und Minton bereits auf dieses durch eine undefinierte Oberfläche erzeugte Problem hingewiesen (Schuck & Minton, Trends Biochem. Sci. (1996) 21 (12): 458-460).

Speziell bei der Immobilisierung von Lipiden auf der modifizierten Goldoberfläche, was z.B. häufig unter Zuhilfenahme micellarer Lösungen oder Lipidvesikel mit darin befindlichen Membranproteinen geschieht, sind die zusätzliche Belegung der Chipoberfläche (bzw. der Bindematrix) und die Schichtdicke der entstehenden Lipidschicht nicht mehr genau definiert. Dies liegt daran, daß eine genaue Kontrolle des Membranverschmelzungs- und Aufbauprozesses, wie z.B. bei der Ausspreitung einer Monoschicht unter Verwendung einer Filmwaage, nicht möglich ist, da ein Meßchip mit bereits immobilisierter Dextran- oder Lipidschicht und den eventuell daran gebundenen Biomolekülen vielen Messungen, wie z.B. genauen Bestimmung des Oberflächenbelegungsgrades und der Schichtdicke, nicht mehr zugänglich ist. Da die auf SPR basierenden Verfahren in der Regel in Zyklen eingesetzt werden, d.h. es werden mehrere Meßreihen nacheinander auf derselben Meßoberfläche (bzw. demselben Meßchip) durchgeführt, treten auch Akkumulations- und Abnutzungseffekte an der Oberfläche auf, was zusätzliche Schwierigkeiten bei der Messung und Auswertung verursacht.

25

EP-A-0 574 000 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung einer Bindematrix, die ein Trägermaterial, z.B. Gold oder Silber, und einen daran gebundenen „Affinitätsträger“ wie z.B. Biotin, enthält, der mit mindestens einem freien Reaktionspartner, z.B. Streptavidin oder Avidin, bindefähig ist. Dieser Affinitätsträger bildet eine durch nicht wechselwirkende Gruppen verdünnte und im wesentlichen lateral homogene Bindeschicht auf der Oberfläche des Trägermaterials. Das Trägermaterial wird dabei mit einer wässrigen Reaktionslösung inkubiert, die den über ein kurzkettiges Spacermolekül

mit dem schichtbildenden Teil des Moleküls verknüpften Affinitätsträger und mindestens ein hydrophiles Verdünnungsmolekül enthält, wodurch sich auf dem Trägermaterial eine sogenannte "gemischte" selbst assemblierende Monoschicht ausbildet.

5 Der Affinitätsträger wirkt in dieser Bindematrix jedoch nicht selbst als Ligand oder Rezeptor sondern dient nur einem weiteren Schichtaufbau durch nicht-kovalente Bindung an Avidin oder Streptavidin, welches dann wiederum biotinylierte Liganden oder Rezeptoren zu binden vermag.

10 Nachteilig bei diesem Verfahren ist weiterhin die Tatsache, daß die Synthese der Konjugate aus dem Affinitätsträger und den Ankerverbindungen mittels derer er an die Oberfläche gebunden ist, in homogener Lösung in relativ großen Volumina erfolgt. Dazu müssen vergleichsweise große Mengen an Substanz eingesetzt werden, gleichzeitig werden aufwendige Arbeitsschritte wie Säulenchromatographie oder
 15 Extraktion erforderlich. Dies macht insbesondere den Einsatz dieses Verfahrens zur Erzeugung einer Vielzahl verschiedener Liganden, etwa bei Screening-Verfahren (HTS) bezüglich neuer Arzneistoffe etc., problematisch. Bei solchen Screening-Verfahren sind besonders miniaturisierbare Verfahren mit hohem Probendurchsatz interessant, die die parallele Messung von Interaktionen zwischen einer Vielzahl verschiedener Liganden mit
 20 einem oder mehreren interessierenden Biomolekülen erlauben. Häufig sind dabei chemische Modifikationen einer Ligandengrundstruktur notwendig bzw. wünschenswert, wie sie z.B. mit Methoden der kombinatorischen Chemie erzeugt werden können, um mit hoher Effizienz den Einfluß solcher Modifikationen auf Affinität oder Spezifität zu messen, etwa im Hinblick auf Bindung, Hemmung oder Aktivierung eines
 25 Enzyms. Insbesondere in diesem Zusammenhang ist das vorstehend genannte Verfahren jedoch ungeeignet.

Ein weiteres Beispiel für eine bekannte Bindematrix, die auch als Binefilm bezeichnet wird, findet sich in der WO 92/10757. Hier wird ebenfalls ein durch
 30 Ankergruppen an ein Trägermaterial adsorbierter Affinitätsträger beschrieben.

In WO 98/31839 wird die Immobilisierung von Nucleinsäuren an für Elektronentransfermessungen geeigneten Oberflächen beschrieben, wobei ein komplexierendes Agens verwendet wird.

- 5 Die Funktionsweise des "Biacore[®]" wurde vorstehend diskutiert und verwendet das für die Biowissenschaften bis vor kurzem wenig gebräuchlichen SPR-Meßprinzip, welches Schichtdickenänderungen an Oberflächen registriert und daher massensensitiv ist. SPR ermöglicht es, die Assoziation von Biomolekülen in Echtzeit, ohne chemische, radiochemische oder immunchemische Markierung und unter nur sehr geringem
- 10 Substanzverbrauch zu beobachten.

Hierbei wird das an einer dünnen Goldschicht reflektierte Licht detektiert. Bei geeigneter Resonanzbedingung (Einfallswinkel und Wellenlänge des Lichtes und Schichtdicke der Goldschicht) nimmt die Intensität des reflektierten Lichtes ab. Die

15 Lichtenergie wird dann in Ladungsdichtewellen des Elektronengases in der Goldschicht umgewandelt. Diese Ladungsdichtewellen nennt man Plasmonen. Um die Resonanz zu beobachten, benutzt man entweder monochromatisches Licht und zeichnet die Intensität des reflektierten Lichtes in Abhängigkeit des Einfallswinkels auf, oder man hält den Einfallswinkel konstant und variiert die Wellenlänge des Lichtes. Die Lage der

20 Resonanz kann durch die Beschichtung auf der dem Lichteinfall abgewandten Seite der Goldschicht verändert werden. Der Rezeptor oder Ligand wird auf der Goldoberfläche immobilisiert. Nach der Zugabe des Ligandes oder Rezeptors wird, wenn diese Moleküle sich anlagern, die Resonanzbedingung geändert.

- 25 1989 brachte Pharmacia (Uppsala, Schweden) den ersten Biosensor auf den Markt, welcher auf der Messung von SPR beruhte.

Vorteile der SPR-Meßmethode liegen in der hohen Meßgenauigkeit der Bestimmung von Brechzahl und Schichtdicke dünner dielektrischer Schichten. Die SPR-

30 Spektroskopie findet daher in den letzten Jahren verstärkt in der biochemischen Analytik Anwendung, da mit ihr die direkte Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Biomolekülen möglich ist. Dazu wird ein Reaktionspartner (Ligand) auf der

Carboxydextran-SAM-Goldoberfläche immobilisiert, der andere Reaktionspartner (Analyt, Rezeptor) wird in Lösung über die Sensoroberfläche geleitet. Die Wechselwirkung ist als Schichtdickenzuwachs direkt nachweisbar.

5 Nachdem sich die SPR-Meßmethode in vielen Bereichen als sehr schlagkräftig erwiesen hat und als etabliert gilt, sollten sich neue Anwendungsbereiche wie dem Hoch-Durchsatz-Screening (High-Throughput Screening = HTS) für SPR-Sensoren erschließen lassen.

10 Zu alternativen Biosensorverfahren, die ebenfalls ein "labeling", ein Markieren des Zielmoleküls mit Fluoreszenzfarbstoffen, hochaffinen Gruppen (Biotin) oder radioaktiven Elementen nicht erforderlich machen und sehr schonend im Umgang und sparsam im Verbrauch der oft sehr kostbaren Biomakromoleküle sind, zählen

- die Schwingquarz-Mikrowaage und
- 15 • die reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIFS).

Bei Biosensoren auf der Basis von Schwingquarz-Mikrowaagen wird die Bindung von Rezeptoren an Liganden mittels der die Schwingungsfrequenz des Schwingquarzes beeinflussenden Massenzunahme gemessen (Ebara und Okahata, JACS 116 (1994)
 20 11209-12). Diese Meßmethode befindet sich noch in der Entwicklungsphase, kommerzielle Geräte sind nicht erhältlich, und die Verwendung für bioanalytische Fragestellungen ist noch wenig dokumentiert.

Mit Hilfe der reflektometrischen Interferenzmikroskopie kann die Teilreflexion
 25 von Licht an Phasenübergängen für die Detektion von Schichtdickenänderungen ausgenutzt werden. Die Anlagerung von Biomolekülen an auf einer transparenten Oberfläche vorliegende Bindungspartner (Liganden) verursacht dabei eine Verschiebung eines Intensitätsprofils in Abhängigkeit der Wellenlänge. Die Verschiebung der ermittelten Kurven ist proportional der Schichtdickenänderung. Im RIFS können jedoch
 30 keine Gold/SAM Oberflächen eingesetzt werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, wohldefinierte SAM-bildende Molekülstrukturen für die Gestaltung von bioaktiven Oberflächen zum Einsatz im HTS bereitzustellen. Zur Vermeidung der oben beschriebenen Nachteile des Standes der Technik sollen die für die Bioaktivität relevanten Struktur motive in vorgelagerten Schritten mit einem SAM-bildenden Anker verknüpft werden und sind danach einer demnach vollständigen analytischen Charakterisierung zugänglich. Erst nach erfolgter, vollständiger Synthese werden diese Konjugate aus Liganden und Ankern (Ligand-Anker-Konjugate, LAK) dann auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert, um so eine biospezifische Grenzschicht in Form einer Monoschicht bioaktiver LAK zu bilden. Zur Synthese der LAK haben sich bekannte Methoden der Festphasensynthese als vorteilhaft erwiesen. In solchen Verfahren wird die Zielstruktur ausgehend von einer festen Oberfläche aufgebaut. So können zunächst der Anker und nachfolgend der daran gebundene Ligand in mehreren Einzelschritten synthetisiert werden. Wahlweise kann ein vorgefertigter Ligand aber auch in einem einzigen Schritt mit dem Anker verknüpft werden. Die Anwendung solcher Syntheseverfahren erlaubt es, Ligand-Anker-Konjugate bereitzustellen, deren Struktur für ihren Einsatz in Form von SAMs in Screeningverfahren optimiert ist. Die Vorteile einer Verknüpfung von kombinatorischer oder hochparalleler Synthese und SAM-Oberflächen sind aus dem derzeit vorliegenden Stand der Technik nicht bekannt.

20

Als Liganden werden im Kontext der vorliegenden Erfindung allgemein Strukturelemente bezeichnet, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenarten spezifische Wechselwirkungen mit Testsubstanzen oder ihren Untereinheiten eingehen können. Mit Hilfe der Liganden können z.B. im Rahmen von Screening-Verfahren Rezeptoren an die Meßoberfläche gebunden werden, die entsprechend kompatible Struktureinheiten aufweisen. Durch die Kenntnis der Struktur des Liganden lassen sich so unter anderem Rückschlüsse auf die Struktur des Rezeptors ziehen.

In der Literatur werden die Begriffe „Ligand“ bzw. „Rezeptor“ oft nicht einheitlich verwendet. Daher sollte betont werden, daß im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Bezeichnung „Ligand“ für solche Moleküle verwendet wird, die, vorzugsweise kovalent, endständig mit dem Anker verknüpft sind. Für die Zwecke der

Interaktionsanalyse werden Liganden mit Hilfe solcher Anker auf den einzusetzenden Meßoberflächen immobilisiert und sorgen damit für die Biospezifität der entstehenden Grenzschicht. Als Beispiele für solche Liganden können Peptide, Oligonukleotide oder auch kleine organische Moleküle angeführt werden.

5

Als „Rezeptoren“ werden Moleküle, vorzugsweise Biomoleküle, bezeichnet, die im Meßmedium vorliegen und deren Fähigkeit zur Wechselwirkung mit der vorgenannten Grenzschicht bzw. mit den darauf präsentierten Liganden der Interaktionsanalyse zugrunde liegt.

10

Eine Bindung der Rezeptormoleküle an die Liganden im Verlauf der Messung erfolgt bevorzugt aufgrund spezifischer korrespondierender sterischer oder elektronischer Strukturen in beiden Molekülen. Dafür kommen z.B. ionische bzw. polare, van der Waals oder weitere hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen in Frage. Eine kovalente Bindung des Rezeptors an den Liganden ist aufgrund der im allgemeinen erheblichen Aktivierungsenergie und der damit verbundenen geringen Spezifität eher nachteilig.

Die Liganden werden im Rahmen der Erfindung mit Hilfe von Ankern auf der Meßoberfläche immobilisiert. Ein Ankermolekül im Sinne der Erfindung umfaßt damit zumindest zwei funktionelle Einheiten, die an entgegengesetzten Enden des Ankers vorliegen, und die zum einen die Verknüpfung mit der Meßoberfläche, zum anderen die Anbindung des Liganden ermöglichen. Zusätzlich sollte bei Anwendung der Festphasensynthese die Möglichkeit bestehen, Grundbausteine des Ankers mit dem zur Synthese verwendeten Feststoffs zu verknüpfen und diese Verbindung nach erfolgreicher Synthese des LAK schonend wieder zu lösen. Als schonend können Verfahren gelten, die das LAK in seinem für die Bereitstellung der biospezifischen Grenzschicht wesentlichen Eigenschaften nicht beeinträchtigen. Die Bindung des Ankers an den Feststoff während der Synthese der LAK ist bevorzugt kovalent.

30

Besonderes Augenmerk liegt bei der Aufgabenstellung darin, Syntheseverfahren z.B. der kombinatorischen Chemie zur Erzeugung von bioaktiven Oberflächen auf der

Basis von organischen Monolagen einzusetzen, wobei die Synthese jedoch aus oben genannten Gründen nicht direkt an der Monolage erfolgen soll. Die kombinatorische Chemie umfaßt eine ganze Bandbreite von Techniken, die in wenigen, oft automatisierten Reaktionsfolgen eine Vielzahl verschiedener Substanzen (sog. Substanzbibliotheken) zu erzeugen vermögen (siehe z.B. M.A. Gallop et al, J. Med. Chem. 37 (1994), 1233-1251, E.M. Gordon et al, J. Med. Chem. 37 (1994), 1385-1401). Auch hierbei werden die Reaktionen aus praktischen Gründen bevorzugt an fester Phase durchgeführt. Die Trägermaterialien sind üblicherweise quervernetzte Polymere in Partikelform (sog. "beads" oder Perlen aus Polystyrol- oder Polyethylenglykol/Polystyrolharz). Ausgehend von einer funktionalisierten Oberfläche werden in mehreren Syntheseschritten die gewünschten Strukturen aufgebaut. Einen Überblick über die Synthese von Substanzbibliotheken an fester Phase sowie in Lösung geben L.A. Thompson und J.A. Ellman, Chem. Rev. 96 (1996), 555-600. Nach Abschluß einer kombinatorischen Festphasensynthese werden die Produkte allgemein von der festen Phase abgespalten, d.h. durch Trennen einer labilen Bindung zwischen Endprodukt und Trägerharz freigesetzt und zum Zwecke des HTS gereinigt oder direkt in biologische Assaymedien transferiert. Es wurde auch versucht, die Produkte auf den Perlen zu belassen und die biomolekularen Interaktionsstudien unmittelbar an dem Trägermaterial durchzuführen. Dies hat jedoch den massiven Nachteil, daß die für die organisch-chemische Synthese geeigneten Substratmaterialien aufgrund ihrer hohen unspezifischen Bindungskapazität für Interaktionsanalysen ungeeignet sind.

Die Synthese einer Bibliothek von LAK, die sich nur in ihren Liganden unterscheiden, wird durch den Einsatz einer vorgefertigten, den Anker bereits enthaltenden Festphase enorm erleichtert. Für die Anker-Konjugat-Synthese vormodifizierten Partikel tragen in diesem Fall bereits alle für den Aufbau oder die Immobilisierung der Liganden erforderlichen molekularen Elemente, einschließlich des gesamten Ankermoleküls. Der Anker ist durch einen Linker an die feste Phase gekoppelt, der die Freisetzung der LAK nach erfolgter Synthese vorzugsweise unter milden Bedingungen erlaubt.

In einfachen Kupplungsreaktionen können Aliquote der vormodifizierten festen Phase dann mit sehr vielen unterschiedlichen Liganden versehen werden. Bei der Abspaltung vom Trägermaterial werden die konjugierten Beschichtungsstrukturen (LAK) freigesetzt, und die Bildung der Monolagen tritt selbsttätig bei Aufbringen der

5 LAK auf die Oberfläche des Meßchips (Kontaktierung) ein.

Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung wird somit eine Bindematrix mit definierter Oberfläche durch einfache chemische Synthese bereitgestellt, die eine hohe Flexibilität hinsichtlich Auswahl und Möglichkeiten chemischer Modifikationen der immobilisierten

10 Liganden bietet und sich für den Einsatz in Verfahren mit hohem Probendurchsatz (HTS) eignet.

Als Trägermaterialien, auf die Anker-Ligand-Konjugate oder Gemische davon zur eigentlichen Messung aufgebracht werden, eignen sich bevorzugt Metalle,

15 Edelmetalle oder Metalloxide bzw. Verbundmaterialien, auf deren Oberflächen Edelmetalle, Metalle wie z.B. Kupfer oder Metalloxide aufgebracht sind. Besonders bevorzugt werden Edelmetalle wie Silber, Gold, Palladium oder Platin eingesetzt, insbesondere eignet sich Gold.

20 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können biospezifische Grenzschichten auch auf Kunststoffen bereitgestellt werden. Hierbei können die Oberflächen handelsüblicher Polymermaterialien, wie Polyalkylene (z.B. PP oder PE), PTFE, PMMA oder Polycarbonate verwendet werden, aber auch Polymermischungen die eines oder mehrere dieser Polymere enthalten. Weiterhin können auch Copolymere aus

25 solchen Monomeren eingesetzt werden, die die genannten Kunststoffe bilden.

Die in der einsatzbereiten Meßanordnung mit dem Träger verbundenen Anker sollten strukturelle Untereinheiten aufweisen, die die folgenden Aufgaben ermöglichen

- a) Anbindung des Ankers an die Meßoberfläche
- 30 b) Kopplung des Liganden L oder dessen Aufbau an den bzw. dem der Meßoberfläche entgegengesetzten Teil des Ankers (ω -ständig);

- c) Ausbildung einer Monoschicht (selbstassemblierte Monolage, SAM) bei Inkontaktbringen der LAK mit der Meßoberfläche.

- 5 Eine schematische Darstellung des Aufbaus eines erfindungsgemen Ankermoleküls ist in der folgenden Abb. 1 wiedergegeben.

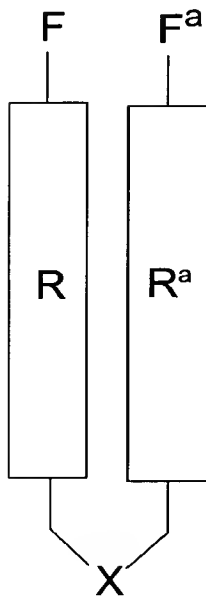


Abb. 1

10

- Die Struktureinheit X erlaubt dabei die Anbindung des LAK an der Meßoberfläche, die Gruppierungen R bzw. R^a umfassen Reste, die die Ausbildung einer SAM ermöglichen. Die endständigen Gruppen F bzw. F^a dienen zur Anbindung von
- 15 Liganden oder Nichtliganden. R^a und F^a gemeinsam oder F^a alleine können gegebenenfalls durch ein Wasserstoffatom ersetzt sein. Die angeführten strukturellen Untereinheiten des Ankers sind direkt oder durch kurzket­tige, bivalente Kupplungsgruppen wie C_1 - C_4 Alkylen, insbesondere Methylen oder Ethylen, kovalent verknüpft (in der schematischen Darstellung durch Striche symbolisiert). Zusätzlich
- 20 kann der Anker eine Struktureinheit Y enthalten, die vom Linker zur Anbindung an die feste Phase während der Synthese herrührt.

Die Gruppierung X dient zur Anbindung des LAK an die Meßoberfläche und enthält bevorzugt ein Element der V. oder VI. Hauptgruppe, wobei auch Kombinationen von identischen oder verschiedenen Elementen verwendet werden können. Vorteilhaft sind hier Kombinationen wie -S-Se- oder -Se-Se-. Ebenfalls vorteilhaft ist, je nach Oberflächenbeschaffenheit die Verwendung von bei neutralem pH ionisiert vorliegenden Gruppen, wie z.B. Sulfonat. Bevorzugt eingesetzt wird Schwefel, z.B. in Form der Disulfidfunktion (-S-S-), der Thiofunktion (-SH) oder der Sulfidfunktion (-S-). Die verwendeten Elemente zeichnen sich dadurch aus, daß sie entweder eine hohe Affinität zu Metallen, insbesondere Edelmetallen (Gold, Silber etc.), aufweisen und somit eine Immobilisierung der erfindungsgemäßen Ligand-Anker-Konjugate z.B. auf einer Gold-, Silber oder Platinoberfläche ermöglichen, oder aber, wenn es sich um eine ionische Gruppe handelt, an eine Metalloxidoberfläche wie z.B. Al₂O₃ binden können.

Es ist bekannt, daß neben Thiolen auch Sulfide besonders zur Ausbildung von SAMs geeignet sind (Troughton et al, Langmuir 4 (1988) 365-85; Schierbaum et al, Science 265 (1994) 1413-5; Huismann et al, JACS 118 (1996) 3523-4). Sulfide zeigen bei der chemischen Synthese, besonders der Festphasensynthese, bezüglich ihrer Stabilität Vorteile gegenüber Thiolen oder Disulfiden.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht daher in Ankermoleklen, die auf Sulfidbasis mit der Meßoberfläche verbunden sind. Die "Sulfid-Anker" können auf einer dem Schwefel abgewandten, omega-stndigen Seite der Kette mit Molekülstrukturen unterschiedlicher Funktionalitäten ausgestattet werden. Es ist besonders vorteilhaft, diese Verknüpfung dem Adsorptionsprozeß voranzustellen und das Konjugat somit vor der Immobilisierung vollständig analytisch zu charakterisieren und auf strukturelle Integrität zu prüfen. Da die Schwefel-Gold Komplexierung eine der wenigen Methoden der nicht-kovalenten Oberflächenmodifizierung darstellt, kann davon ausgegangen werden, daß die Konjugate durch den Adsorptionsprozeß keine Veränderung ihrer chemischen Struktur erfahren. Durch die Verwendung solcher funktionalisierter Konjugate kann jegliche weitere sich der chemischen Analytik entziehende Oberflächenmodifizierung vermieden

werden. Zur Erzeugung auch strukturell komplexer biospezifischer Grenzschichten auf Oberflächen ist daher nur ein einzelner Beschichtungsschritt erforderlich.

Von der chemischen Natur der eingesetzten Gruppe X hängt gleichzeitig die chemische Grundstruktur des Ankers ab. Durch den Einsatz von Thiolen werden LAKs erzeugt, die lediglich eine einzelne Kette, die gegebenenfalls verzweigt sein kann, aufweisen. Demgegenüber sind durch Verwendung von Sulfiden und Disulfiden Anker zugänglich, wie sie beispielhaft in Abb. 1 gezeigt sind; sie beinhalten zwei durch die Gruppe X voneinander getrennte Kettenstrukturen.

10

Werden die erfindungsgemäßem LAK auf Kunststoffoberflächen aufgebracht, so dienen die oben aufgeführten Gruppen X vor allem zur Strukturierung des Ankermoleküls, während sich eine attraktive Wechselwirkung zwischen der Gruppe R bzw. den Gruppen R und R^a und der Polymeroberfläche ausbildet.

15

Die Reste R und R^a können gleich oder verschieden sein und stellen eine verzweigte oder unverzweigte, gegebenenfalls substituierte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffkette dar, die durch Heteroatome, Aromaten und heterozyklische Verbindungen unterbrochen sein kann und 2-2000 Atome, einschließlich Heteroatome, umfaßt. Sind Struktureinheiten des Typs X, z.B. durch Einsatz mehrvalenter Reste R oder R^a , miteinander verknüpft, ist auch der Aufbau von oligomeren LAK möglich, die schematisch in der folgenden Abbildung 2 dargestellt sind, wobei n eine natürliche Zahl ≥ 0 darstellt. Die Reste R^a und F^a sind dabei wie vorstehend definiert und können ebenfalls jeweils gleich oder verschieden sein.

25

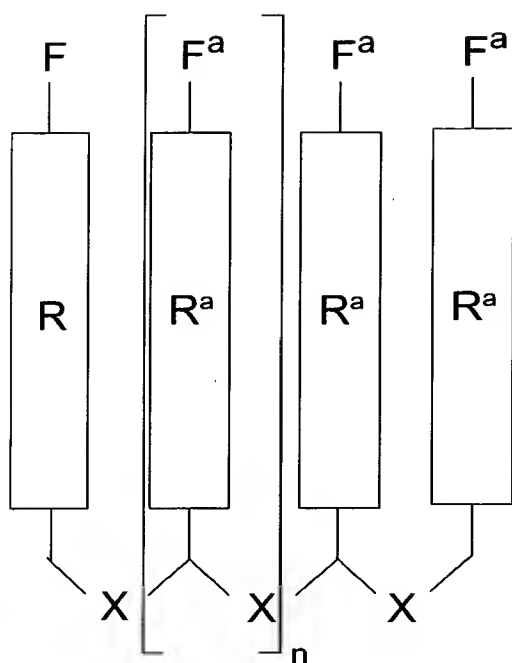


Abb. 2

- 5 Die erfindungsgemäßen Anker sind ω -ständig bezüglich der Gruppe X funktionalisiert, um so die Anbindung der Liganden zu ermöglichen. Funktionelle Gruppen F bzw. F^a , die zu diesem Zweck eingesetzt werden können, sind u.a.: Acetale, Ketale, Acylale, Acylhalogenide, Alkohole (Hydroxylgruppen), Aldehyde, Alkene, Halogenide, Alkine, Allene, Amide, Amidine, Aminale, Amine, Anhydride, Azide, Azine, Aziridine, Azoverbindungen, Borane, Carbamate, Carbodiimide, Carbonsäuren, Carbonsäureester, Cyanamide, Cyanate, Diazoverbindungen, Diazoniumsalze, Epoxide, Ether, Hydrazide, Hydrazine, Hydrazone, Hydroxamsäuren, Hydroxamsäureester, Hydroxylamine, Imide, Imine, Anorganische Ester, Isocyanate, Isocyanide, Isothiocyanate, Ketene, Ketone, Nitrile, Nitroverbindungen, Nitrosoverbindungen, Oxime, Phenole, Phosphine, Phosphonate, Ammoniumsalze, Phosphoniumsalze, Sulfonamide, Sulfone, Sulfonsäuren, Sulfonester, Sulfoniumsalze, Sulfonylazide, Sulfonylhalogenide, Sulfoxide, Thioamide, Thiocarbamate, Thiocyanate, Triazene, Harnstoffe oder Isoharnstoffe. Die Reste F und F^a können gleich oder verschieden sein, F^a kann durch ein Wasserstoffatom ersetzt sein. Sie sollten bevorzugt weniger als 10,

besonders bevorzugt weniger als 4 C-Atome umfassen. Besonders bevorzugt als funktionelle Gruppen F und F^a sind Hydroxylgruppen, primäre oder sekundäre Amine, bevorzugt C₁-C₄ N-alkyliert, und Carbonsäuren die direkt als Substituenten mit R bzw. R^a verbunden sind. Sie können gegebenenfalls aktiviert werden (z.B. als Aktivester), um
 5 so die Verknüpfung mit den Liganden zu erleichtern.

Reaktionen zur Bindung des Liganden an den Anker können z.B. Substitutions- oder Additionsreaktionen, Eliminierungsreaktionen (Additions-Eliminierungsreaktionen wie Kondensationsreaktionen) sein, es können Reaktionen zur Ausbildung einer
 10 Doppelbindung, wie z.B. Wittig-Reaktion, oder einer C-C-Einfachbindung, z. B. Aldol, Heck- oder Suzuki-Reaktion, oder elektrozyklische Reaktionen sein. Diese Aufzählung ist nicht erschöpfend oder einschränkend und kann leicht von einem Fachmann ergänzt werden.

15 Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß für die Anbindung des Liganden an den Anker und die Anbindung an die feste Phase die gleiche funktionelle Gruppe verwendet werden kann, da letztere während der Anbindung des Liganden durch die feste Phase regioselektiv "blockiert" ist.

20 Funktionelle Reste (Y), die die Ankerstruktur aufgrund ihrer Anbindung an eine feste Phase (P) während ihrer Synthese auch nach der Trennung der LAK vom Linker enthalten kann, umfassen: Acetale, Ketale, Acylale, Acylhalogenide, Alkohole, Aldehyde, Alkene, Halogenide, Alkine, Allene, Amide, Amidine, Aminale, Amine, Anhydride, Azide, Azine, Aziridine, Azoverbindungen, Borane, Carbamate,
 25 Carbodiimide, Carbonsäuren, Carbonsäureester, Cyanamide, Cyanate, Diazoverbindungen, Diazoniumsalze, Epoxide, Ether, Hydrazide, Hydrazine, Hydrazone, Hydroxamsäuren, Hydroxamsäureester, Hydroxylamine, Imide, Imine, Anorganische Ester, Isocyanate, Isocyanide, Isothiocyanate, Ketene, Ketone, Nitrile, Nitroverbindungen, Nitrosoverbindungen, Oxime, Phenole, Phosphine, Phosphonate,
 30 Ammoniumsalze, Phosphoniumsalze, Sulfonamide, Sulfone, Sulfonsäuren, Sulfonester, Sulfoniumsalze, Sulfonylazide, Sulfonylhalogenide, Sulfoxide, Thioamide, Thiocarbamate, Thiocyanate, Triazene, Harnstoffe oder Isoharnstoffe. Diese Reste sind

bevorzugt direkt oder über eine gegebenenfalls in Y enthaltene Seitenkette mit dem Rest des Ankers verknüpft, wobei die Seitenkette 1-8, bevorzugt 1-4 C-Atome aufweist. Sie kann durch weitere funktionelle Einheiten, insbesondere –O- oder –CONH- unterbrochen sein. Der Rest Y in seiner Gesamtheit umfaßt nicht mehr als 20, bevorzugt nicht mehr als 10, besonders bevorzugt nicht mehr als 5 C-Atome.

Bei Verwendung spezieller Linkerverbindungen zur Verknüpfung des Ankers mit der festen Phase („traceless linker“) kann das LAK auch ohne Zurückbleiben einer funktionellen Gruppe an der Ankerstruktur gelöst werden. Der Linker wird in diesem Fall bei der Abspaltung durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß trotz des Vorhandenseins einer funktionellen Gruppe Y in einem Seitenarm des Ankers die Ausbildung von SAMs nicht oder nur geringfügig gestört wird, so daß auf konventionelle, meist auch kostengünstigere Linker zurückgegriffen werden kann, die solche Gruppen hinterlassen.

Linker, die vorteilhaft in der Festphasensynthese einzusetzen sind, wie auch Reste, die nach der Trennung des Zielmoleküls von der festen Phase an diesem verbleiben, sind z.B. in Novabiochem® Combinatorial Chemistry Catalog & Solid Phase Organic Chemistry Handbook, März '98, Callbiochem-Novobiochem AG, Schweiz beschrieben. Bei der Verwendung identischer Linker kann die Struktur der resultierenden Gruppen Y je nach eingesetztem Spaltungsreagenz variieren. Bevorzugte funktionelle Gruppen, die nach der Abspaltung der LAK von der festen Phase am Anker verbleiben, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Y an P gebunden	Y nach Abspaltung von festen Phase (P)
-CO-	-COOH -COOR' -CHO -CH ₂ OH -CO-NR' ₂ -CO-NH-OH -CO-NH-NH ₂ -cyclo[CO-NH-CH(R')-CO-NH-CH]
-O-	-OH

wobei jeder der Reste R' unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest, bevorzugt ein Wasserstoffatom oder ein C₁-C₄- Alkylrest sein kann. Liegt die Gruppierung Y vor, so sind besonders bevorzugt -CONR'₂, -COOH oder -OH.

5 Die oben als bevorzugt und besonders bevorzugt aufgeführten Gruppen Y können zusätzlich an der freien Valenz eine Kupplungsgruppe umfassen, mittels derer sie mit dem Rest der Ankerstruktur, bevorzugt mit R oder R^a verknüpft sind. Bei der Kupplungsgruppe handelt es sich bevorzugt um einen mindestens bivalenten organischen Rest, der geradkettig oder verzweigt sein kann und bevorzugt 1-8,
10 besonders bevorzugt 1-4 Kohlenstoffatome umfaßt. Er kann durch zusätzliche funktionelle Einheiten, insbesondere -O-, -CONR'-, unterbrochen sein, wobei R' wie oben definiert ist. Besonders bevorzugt sind C₁-C₄- Alkylreste, wie Methylen, Ethylen oder Propylen.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die genannte freie Valenz direkt mit R bzw. R^a verbunden.

Bevorzugt sollte der Anker Strukturen aufweisen, die eine passive Adsorption des Rezeptors sowohl an der Ankerstruktur als auch auf der Meßoberfläche erschweren
20 oder vermeiden. Weiterhin ist es von Vorteil, wenn der Anker eine Spacergruppierung enthält, die die Anpassung der Gesamtkettenlänge und der Flexibilität des LAK ermöglicht.

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Anker stellt damit die
25 in Abbildung 3 schematisch wiedergegebene Struktur dar,

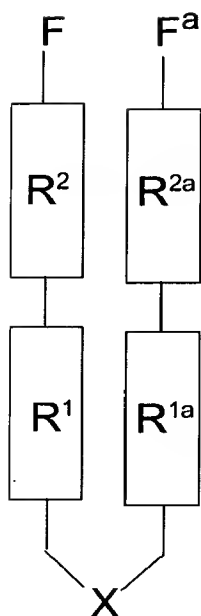


Abb. 3

wobei F , F^a und X wie vorstehend definiert sind, und R^1 und R^2 bzw. R^{1a} mit R^{2a} jeweils die Reste R bzw. R^a bilden. Der Rest Y , soweit vorhanden, kann bevorzugt entweder an R^1 bzw. R^{1a} oder an R^2 bzw. R^{2a} als Seitenkette gebunden vorliegen. Besonders bevorzugt befindet er sich nahe oder an der Verknüpfungsstelle zwischen R^1 bzw. R^{1a} und R^2 bzw. R^{2a} .

Bevorzugt dienen R^1 und R^{1a} zur Ausbildung eines SAMs und sollen zu diesem Zweck weitgehend hydrophob sein. Sie umfassen unabhängig voneinander eine verzweigte oder unverzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 50 C-Atomen, die vollständig gesättigt oder teilweise ungesättigt und dabei durch Aromaten, Heterozyklen oder Heteroatome unterbrochen sein kann, wobei eine vollständig gesättigte Kohlenwasserstoffkette ohne Heteroatome bevorzugt ist. Sie hat in einer bevorzugten Form die allgemeine Formel $-(CH_2)_n-$, wobei n eine natürliche Zahl von 1 bis 50, vorzugsweise 3 bis 25, besonders bevorzugt 4 bis 18 und am meisten bevorzugt 8 bis 12 ist.

Für die Einführung von R^1 und/oder R^{1a} in einer besonders bevorzugten Form eignen sich kommerziell erhältliche Verbindungen, insbesondere funktionalisierte Alkane, die an beiden Endgruppen funktionelle Einheiten, wie z.B. Hydroxylgruppen, Halogenatome, Carbonsäuregruppen oder Mercaptogruppen tragen. Diese terminalen funktionellen Einheiten erleichtern z.B. die Verbindung zu den benachbarten Struktureinheiten während der Synthese des Ankers. Wahlweise können mit ihrer Hilfe notwendige Bestandteile des Ankers, z.B. X, eingeführt werden. Beispielfhaft sollen 11-Brom-1-undecanol, 1,10-Decandiol oder 11-Mercaptoundecansäure sowie deren Derivate, angeführt werden, wobei bei letzteren gleichzeitig die Einführung der Schwefelfunktion (X) gewährleistet ist.

R^2 und R^{2a} stellen bevorzugt Spacer dar, die die Anpassung der Gesamtkettenlänge und der Flexibilität des Ligand-Anker-Konjugates ermöglichen. Sie stellen unabhängig voneinander bevorzugt Kohlenwasserstoffketten dar, die durch Heteroatome unterbrochen und dadurch hydrophil sind und bevorzugt eine passive Adsorption des Rezeptors erschweren. Die Kette umfaßt 2 bis 1000 Atome, einschließlich Heteroatome, bevorzugt sind Kettenlängen von 5 bis 500, ganz besonders bevorzugt sind Kettenlängen zwischen 10 und 100 Atomen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist R^2 und/oder R^{2a} ein Oligoether der allgemeinen Formel $-(OAlk)_y-$, bei der y eine natürliche Zahl ist und Alk einen Alkylrest darstellt. Bevorzugt ist eine Struktur, bei der y zwischen 1 und 100, bevorzugt zwischen 1 und 20 und am meisten bevorzugt zwischen 2 und 10 liegt. Der Rest Alk weist bevorzugt 1-20, besonders bevorzugt 2-10 und insbesondere bevorzugt 2-5 C-Atome auf. Ganz besonders bevorzugt ist $-(OC_2H_4)_y-$

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform ist R^2 und/oder R^{2a} ein Oligoamid, aufgebaut aus Dicarbonsäuren und Diaminen und/oder Aminocarbonsäuren, wobei die Amine unabhängig voneinander bevorzugt 1 bis 20, besonders bevorzugt 1 bis 10 Kohlenstoffatome aufweisen und auch durch weitere Heteroatome, insbesondere Sauerstoffatome, unterbrochen sein können. Die Carbonsäuremonomere besitzen unabhängig voneinander bevorzugt 1 bis 20, besonders bevorzugt 1 bis 10

Kohlenstoffatome und können ebenfalls durch weitere Heteroatome, insbesondere Sauerstoffatome, unterbrochen sein.

Für die Einführung von R^2 und/oder R^{2a} in einer besonders bevorzugten Form
 5 eignen sich kommerziell erhältliche Verbindungen, wie insbesondere Glycolether wie
 z.B. Triethylenglycol, Triethylenglycolmonomethylether, Tetraethylenglycol, aber auch
 Dicarbonsäuren wie Bernsteinsäure, 1,13-Diamino-4,7,10-triooxatridecan, 3,6,9-
 Trioxaundecandisäure, 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure oder 4-Aminobenzoessäure sowie
 deren Derivate oder Kombinationen aus gleichen Bausteinen (wie. z.B. bei 8-Amino-3,6-
 10 dioxaoctansäure oder 4-Aminobenzoessäure) oder Kombinationen aus verschiedenen
 Bausteinen (wie z.B. 1,13-Diamino-4,7,10-triooxatridecan und 3,6,9-
 Trioxaundecandisäure in alternierender Folge). Ein Vorteil bei der Verwendung von 4-
 Aminobenzoessäure liegt in ihrer guten spektroskopischen Detektierbarkeit z.B. mittels
 UV-Spektroskopie.

15

Während R^1 und R^2 in der in Abbildung 3 angegebenen Strukturformel vorhanden
 sein müssen, können eine oder zwei beliebige Struktureinheiten, ausgewählt aus R^{1a} , R^{2a}
 und F^a gegebenenfalls fehlen. Auch die Kombination aus R^{1a} , R^{2a} und F^a kann
 gegebenenfalls vollständig durch ein Wasserstoffatom ersetzt sein.

20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung
 werden die Ankerstrukturen 1 bis 16, wie unten illustriert, bereitgestellt.

In der bevorzugten Form des Ankers, die zwei Äste aufweist, stehen zwei dieser
 25 Endgruppen F und F^a zur Verfügung. Sie können zur Bereitstellung der LAK beide durch
 Liganden (L) besetzt sein, die mit dem Rezeptor in Interaktion treten können. Bevorzugt
 ist nur eine Endgruppe mit einem Liganden besetzt, während die andere mit einer
 niedermolekularen Verbindung (N) abgesättigt ist, die nicht zu einer solchen Interaktion
 fähig ist (Nichtligand). Die entsprechende Struktur ist in Abb. 4 gezeigt:

30

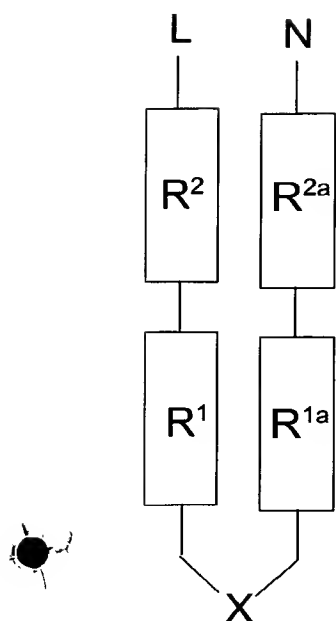


Abb. 4

Solche SAM bildenden Unterstrukturen der LAK, die mit einer Gruppierung N für Detektionszwecke nicht mehr zur Verfügung stehen, ermöglichen eine genaue Strukturierung der interaktionsfähigen Liganden auf der Meßoberfläche, während gleichzeitig in den entstehenden Zwischenräumen eine passive, d.h. unspezifische Adsorption des Rezeptors vermieden wird. Sie werden als „Verdünnerelemente“ bezeichnet. Gegebenenfalls können bei der Bereitstellung der Meßoberfläche zusätzlich Ankerstrukturen eingesetzt werden, die ausschließlich Gruppierungen N tragen, um diesen Effekt noch zu verstärken.

Der Ligand L dient zur Bereitstellung spezifischer Strukturmerkmale in der erzeugten Grenzschicht, die damit für eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor zur Verfügung steht. Im Rahmen der Festphasensynthese kann Ligand L in einem einzelnen Schritt mit dem Anker verknüpft oder in mehreren Syntheseschritten am Anker aufgebaut werden. Letzteres Verfahren ist insbesondere beim Einsatz kombinatorischer Synthesemethoden von Vorteil, bei denen unter Verwendung von Gemischen aus zwei oder mehr Synthesebausteinen eine große Anzahl strukturell diversifizierter Liganden in wenigen Schritten erzeugt werden kann. Liganden, die typischerweise verwendet werden,

um der Meßoberfläche eine Bioaktivität zu verleihen, umfassen: Proteine, Peptide, Oligonucleotide, Kohlenhydrate (Glycoside), Isoprenoide, Enzyme, Lipidstrukturen, sowie organische Moleküle, die bevorzugt ein Molekulargewicht ≥ 75 g/mol besitzen und charakteristische räumliche oder elektronische Strukturen aufweisen, wie z.B. eine

5 Aminosäure, ein Nukleosid, eine heterocyclische Verbindung, eine alicyclische Verbindung, eine aromatische Verbindung, ein Terpen, eine phosphororganische Verbindung, ein Chelatkomplex, Neurotransmitter, ein substituiertes Amin, ein Alkohol, ein Ester, ein Ether oder eine Carbonsäure und deren Derivate. Sie können unter Verwendung literaturbekannter Reaktionen (siehe z.B. J.S. Früchtel, G. Jung, Angew.

10 Chem. Int. Ed. 35, (1996) 17-42) synthetisiert werden. Diese Aufzählung ist weder erschöpfend noch beschränkend und kann vom Fachmann mühelos ergänzt werden.

Trägt das LAK einen Rest N, so stellt dieser eine niedermolekulare Verbindung mit einem Molekulargewicht < 75 g/mol dar, z.B. einen C_1 - C_4 Alkoxyrest, bevorzugt

15 Methoxy, oder Acyloxy, bevorzugt Acetyloxy, oder Aminoethyl dar. Die Möglichkeit einer Wechselwirkung des Rezeptors mit solchen Nichtliganden N ist zwar nicht auszuschließen, jedoch aufgrund der einfachen Struktur solcher Gruppierungen gering. In Fällen, wo ein zweiarmiger Anker verwendet wird, der sowohl einen Rest L als auch einen Rest N trägt, ist bevorzugt der mit dem Liganden endende Ast länger als

20 der nicht funktionell abgesättigte. Besonders gute Ergebnisse zeigen sich bei einem Längenverhältnis von etwa 2:1.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bereitstellung der Ligand-Anker-Konjugate umfaßt die folgenden Schritte:

- 25 a) Immobilisation oder Synthese eines Ankers an einer für die chemische Synthese geeigneten festen Phase P
- b) Bindung oder Synthese eines Liganden L an den Anker zur Bildung eines Ligand Anker-Konjugates an der festen Phase P;
- c) Abspalten des Ligand-Anker-Konjugates von der festen Phase P.

30

Im Anschluß an die Abspaltung kann das LAK an ein geeignetes Trägermaterial gebunden werden, um so eine einsatzbereite Meßoberfläche zu erhalten.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird zunächst eine Verbindung, die in der Regel einen Teil des Ankers darstellt und eine funktionelle Gruppe trägt, mit Hilfe dieser Gruppe an einer für die Festphasensynthese geeignete feste Phase immobilisiert. Zur Anbindung des Ankers an das Harz geht die Festphasensynthese von Verbindungen aus, die beispielsweise folgende funktionellen Gruppen enthalten: Acetale, Ketale, Acylale, Acylhalogenide, Alkohole, Aldehyde, Alkene, Halogenide, Alkine, Allene, Amide, Amidine, Aminale, Amine, Anhydride, Azide, Azine, Aziridine, Azoverbindungen, Borane, Carbamate, Carbodiimide, Carbonsäuren, Carbonsäureester, Cyanamide, Cyanate, Diazoverbindungen, Diazoniumsalze, Epoxide, Ether, Hydrazide, Hydrazine, Hydrazone, Hydroxamsäuren, Hydroxamsäureester, Hydroxylamine, Imide, Imine, Anorganische Ester, Isocyanate, Isocyanide, Isothiocyanate, Ketene, Ketone, Nitrile, Nitroverbindungen, Nitrosoverbindungen, Oxime, Phenole, Phosphine, Phosphonate, Ammoniumsalze, Phosphoniumsalze, Sulfonamide, Sulfone, Sulfonsäuren, Sulfonester, Sulfoniumsalze, Sulfonylazide, Sulfonylhalogenide, Sulfoxide, Thioamide, Thiocarbamate, Thiocyanate, Triazene, Harnstoffe, Isoharnstoffe.

Besonders bevorzugt ist die Ausbildung von Amid- oder Esterbindungen. Hierbei können an der festen Phase Amino-, Hydroxyl, oder Carboxylfunktionen vorliegen. Der Anker bzw. ein Teil des Ankers enthält dann entsprechend eine komplementäre funktionelle Gruppe.

Bei der Abspaltung können diese funktionellen Gruppen am LAK unverändert oder in veränderter Form (z.B. durch Reaktion mit dem Spaltungsreagenz, dem Lösemittel, durch Aktivierung, durch Blockierung oder indem Teile des Linkers am Anker verbleiben) vorliegen. Ebenso können diese Gruppen oder Teile des Ankers am Linker und somit an der festen Phase verbleiben.

Die feste Phase kann ein Syntheseharz, ein Synthesepolymerfilm oder eine zur Synthese geeignete Silizium- oder Silikatfläche sein. Im Falle der Syntheseharze können prinzipiell verschiedene Typen von Harzen eingesetzt werden. Partikelförmige Polymerharze auf Polystyrol- oder Polystyrol-Polyethylenglykolbasis sind in der Festphasenpeptidsynthese und der kombinatorischen Chemie fest etabliert und

außerordentlich hilfreich bei der Durchführung mehrstufiger Reaktionsfolgen. Als Syntheseharze können kommerziell erhältliche Harze verwendet werden, die direkt oder nach ihrer Modifikation, bevorzugt durch Umsetzung mit Glycolsäure, zum Einsatz kommen. Zur Bindungsvermittlung sind kommerzielle Harze mit sogenannten Linkern
 5 versehen, d.h. Verbindungen, die mindestens zwei funktionelle Gruppen bereitstellen und während der Synthese sowohl an die feste Phase als auch an den Anker gebunden sind. Insbesondere können Halomethylharze eingesetzt werden, z.B. Merrifield-Harz. Bei Verwendung dieser Harze ist die funktionelle Gruppe am Ausgangsmolekül für die LAK-Synthese bevorzugt $-\text{COOH}$ oder $-\text{OH}$. Im Falle einer Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$)
 10 COOH) liegt diese nach der Abspaltung vom Harz häufig als $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$ oder $-\text{COOCH}_3$ vor. Bei einer Hydroxylgruppe ($-\text{OH}$) liegt diese nach der Abspaltung bevorzugt unverändert vor. Für den Fall einer Aminogruppe ($-\text{NH}_2$), liegt nach der Abspaltung bevorzugt $-\text{NHSO}_2-$ vor. Eine weitere vorteilhafte Ausführungsform basiert auf der Verwendung von Hydroxyharzen, wobei eine Cyano-, Carboxyl- oder
 15 Hydroxylgruppe im genannten Ausgangsmolekül vorhanden sein kann. Liegt eine Isocyanogruppe ($-\text{NCO}$) vor, so ergibt die Abspaltung bevorzugt ein Harnstoffderivat $-\text{NHCONH}-$. Im Fall der Carboxylgruppe entstehen nach der Abspaltung vom Harz bevorzugt folgende funktionellen Gruppen: $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONH}-$, $-\text{CONHNH}_2$. Angegebene freie Valenzen dieser Gruppen sind
 20 gegebenenfalls bevorzugt mit einem $\text{C}_1\text{-C}_4$ Alkylrest abgesättigt. Bei einer Hydroxygruppe, entsteht bevorzugt wiederum eine Hydroxy-Funktion. In einer bevorzugten Ausführungsform wird als feste Phase das Harz NovaSyn® TGA (Calbiochem-Novabiochem AG, Schweiz) verwendet. Die Verwendung von Aminoharzen hat sich ebenfalls als vorteilhaft erwiesen, wobei bevorzugt eine
 25 Carboxylfunktion zur Anbindung verwendet wird und nach Abspaltung des LAK von der festen Phase als $-\text{CONH}-$, $-\text{CHO}$ oder $-\text{CO}-$ vorliegen kann. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird als Aminoharz Tentagel RAM® (Rapp Polymere, Tübingen) verwendet.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform werden als feste Phase
 30 Tritylharze verwendet, wobei hier die Anbindung über $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{CONHNH}_2$ erfolgen kann. Die nach Abspaltung von der festen Phase entstehende funktionelle Gruppe liegt in diesem Fall anschließend wieder in der ursprünglichen Form vor. In

einer bevorzugten Ausführungsform wird das 2-Chlortritylchloridharz (Calbiochem-Novabiochem AG, Schweiz) verwendet. Der Einsatz von Dihydropyran- oder Carboxyharzen als feste Phase hat sich ebenfalls als vorteilhaft erwiesen, wobei in einer bevorzugten Ausführungsform eine Hydroxygruppe im Ausgangsmolekül der LAK
 5 Synthese vorliegt und nach Abspaltung unverändert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Carboxyharz NovaSyn® TG Carboxy (Calbiochem-Novabiochem AG, Schweiz) oder das Dihydropyranharz DHP HM-Harz (Calbiochem-Novabiochem AG, Schweiz) verwendet. Weitere vorteilhafte Ausführungsformen umfassen Arylsiloxyharze, wobei die funktionelle Gruppe ein Halogenatom sein
 10 kann. Hier tritt nun der Fall auf, daß nach der Abspaltung des LAK von der festen Phase (dem Harz) an dem Ankerelement A ein Bestandteil des Linkers, bzw. der festen Phase gebunden ist, da nach Abspaltung anstelle des Halogenatoms bevorzugt die Funktion – Ar-H auftritt, wobei Ar ein aromatischer Rest ist, der von der festen Phase (dem Arylsiloxyharz) stammt.

15

Als Ausgangsmolekül für die Synthese der LAK und zur Anbindung an das Harz in einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich kommerziell erhältliche Verbindungen, wie Lysin, Lysinol oder 2,3-Diaminopropionsäure sowie deren Derivate, die entsprechend zweifach orthogonal geschützt erhältlich sind. Zur Anbindung an das
 20 Harz sind alle vorhandenen Funktionalitäten möglich. Nach der Abspaltung entsteht Y, je nach Abspaltungsbedingung, bevorzugt als ein Methyramid-, Methylcarboxyl- oder Methylhydroxlyrest.

Die Abspaltung des Ligand-Anker-Konjugates von der festen Phase P kann auch
 25 durch eine intramolekulare Zyklisierung induziert werden. Ist der Linker ein Dipeptid, z.B. Lys-Pro, wobei Prolin C-terminal an das Harz gebunden ist, so entsteht nach der Abspaltung vom Harz ein Diketopiperazin [Anker 3, „DKP-Anker“], z.B. durch Abspaltung einer Schutzgruppe, bevorzugt alpha-tert. Butyloxycarbonyl-geschützt, wodurch die spontane Zyklisierung induziert wird. Es besteht auch die Möglichkeit,
 30 nach Abspaltung von P ein Pyrazolon zu bilden, und zwar dann, wenn der Linker eine β -Ketocarbonsäure umfaßt und zur Abspaltung beispielsweise Phenylhydrazin verwendet

wird. Das Prinzip der Abspaltung vom Harz durch spontane Zyklisierung nach Deblockierung ist nicht nur auf Diketopiperazine oder Pyrazolone beschränkt.

Die Aufzählung der Harze und Funktionen ist nicht abschließend und kann
 5 mühelos vom Fachmann erweitert werden. Eine Übersicht hierzu liefert
 "Novabiochem® Combinatorial Chemistry Catalog & Solid Phase Organic Chemistry
 Handbook" März '98, Calbiochem-Novobiochem AG, Schweiz.

Das oben beschriebene Verfahren bietet die Möglichkeit, kombinatorische
 10 Chemie zur Festphasensynthese von Ligand-Anker-Konjugaten einzusetzen. Dies
 erzeugt eine Reihe vorteilhafter Effekte, wie z.B. die Möglichkeit, eine große Anzahl von
 verschiedenen Konjugaten herzustellen und diese später einzeln oder in Kombination
 zum „Drug-Screening“ oder für Bindungsmessungen einzusetzen.

15

Insbesondere bevorzugt sind Kombinationen von R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , X und Y, wie
 sie im folgenden in den Ankerstrukturen 1-3, 8-10, 12 und 14-16 zu finden sind.

Ein weiterer bevorzugter Aufbau von Ligand-Anker-Konjugaten nach Abb.1
 20 ergibt sich, wenn bei der Synthese eines zweiarmigen LAK die Anknüpfung an die feste
 Phase an einer Stelle erfolgt, die für den Liganden bzw. Nichtliganden vorgesehen
 ist. Bei Abspaltung des LAK unter geeigneten Bedingungen wird anschließend die feste
 Phase direkt durch einen Nichtliganden ersetzt. Der Aufbau des Ankers erfolgt in diesem
 Fall nicht in einer konvergenten Synthese sondern linear ("straight forward"). Für den
 25 Ankeraufbau gelten ebenso die oben genannten Ausführungen zu R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , X und
 Y. Insbesondere bevorzugt sind in diesem Fall Kombinationen von R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , X
 und Y, wie sie in den Ankerstrukturen 4-7 in den Beispielen zu finden sind.

Im Rahmen der Festphasensynthese von Verdünnerkomponenten, d.h. Ankern die
 30 ausschließlich Nichtliganden tragen, ist es ebenfalls möglich, die Anknüpfung an die
 feste Phase anstelle eines Nichtliganden durchzuführen. Hierbei handelt es sich dann
 ebenfalls um eine lineare Synthesestrategie. Für den Ankeraufbau gelten die oben

genannten Ausführungen zu R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , X und Y. Insbesondere bevorzugt sind in diesem Fall Kombinationen von R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , X und Y, wie sie in den Ankerstrukturen 10 und 13 zu finden sind.

5 Unter den Strukturen gemäß Abb. 1 sind mit dem erfindungsgemäßen Verfahren auch Thiolanker darstellbar. Für den Ankeraufbau gelten hier die oben genannten Ausführungen zu R^1 , R^2 , X und Y. Insbesondere bevorzugt sind in diesem Fall Kombinationen von R^1 , R^2 , X und Y, wie sie in der Ankerstruktur 11 zu finden ist.

10 Die Synthese eines Verdünners, die nicht nach dem erfindungsgemäßen Verfahren dargestellt wird, ist in Beispiel 2 dargestellt.

Bei Verwendung der oben beschriebenen SAM bildenden Anker, die mit einer geeigneten Gruppe X versehen sind, genügt es, die LAK nach Abspaltung von der festen
15 Phase mit dem Trägermaterial in Kontakt zu bringen, um die einsatzbereite Meßoberfläche zu erhalten. Dabei kann der Träger z.B. in einer wäßrigen Lösung der LAK inkubiert werden, oder solche Lösungen können gezielt auf abgegrenzte Bereiche oder Trägeroberflächen aufgebracht werden, z.B. durch plotting-Verfahren. So wird der parallele Einsatz von LAKs ermöglicht, die unterschiedliche Liganden tragen. Alternativ
20 können auch Gemische verschiedener LAKs eingesetzt werden.

Um gezielt Bereiche zu erzeugen, die die Bindung eines Rezeptors ermöglichen, während gleichzeitig Bereiche der Oberfläche nicht für die Detektion aktiv sind, können zusätzlich Anker aufgebracht werden, die keine Liganden tragen und ausschließlich mit
25 Resten B gesättigt sind. Solche Verdünnerkomponenten können auch dazu eingesetzt werden, die Liganden auf der Oberfläche räumlich zu isolieren, um bei Vorliegen eines sterisch ausladenden Rezeptors eine passive Bedeckung von Interaktionspartnern zu vermeiden. Wie für Thiole gezeigt wurde, spielt die Ligandendichte (LAK-Dichte) eine wichtige Rolle bei der molekularen Erkennung von Rezeptoren (B.T. Houseman, M.
30 Mrksich, Angew. Chem. 111 (1999), 876-880). Vergleichbares gilt für Sulfide. Um eine optimale Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor zu gewährleisten, müssen unterschiedliche Mischungen von LAK und Verdünner hergestellt und auf der

Trägeroberfläche präsentiert werden. Dies ist zuverlässig nur möglich, wenn beide vorher gemischt wurden. Hierin liegt ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, da ein LAK-Aufbau auf der Trägeroberfläche keine gleichmäßigen Verdünnungen gewährleisten kann.

5

Die erfindungsgemäße Meßoberfläche findet vorzugweise bei der zur elektrochemischen und spektroskopischen Messung von molekularen Interaktionen zwischen immobilisierten Liganden und nicht immobilisierten Interaktionspartnern, insbesondere Biomolekülen Verwendung. Sie kann damit auch vorteilhaft im

10 medizinisch-diagnostischen Bereich eingesetzt werden.

Aufgrund ihrer vorstehend beschriebenen Vorteile können die erfindungsgemäßen Oberflächen jedoch auch in klassischen Verfahren, wie der Affinitätschromatographie, Anwendung finden.

15

Als Rezeptor fungierende Moleküle sind bevorzugt in biologischen Systemen auftretende oder mit diesen interagierende Moleküle, wie Proteine, DNA, RNA, Oligonucleotide, prosthetische Gruppen, Vitamine, Lipide, Mono-, Oligo- und Polysaccharide, aber auch synthetische Moleküle wie z.B. Fusionsproteine und

20 synthetisierte Primer.

Zur Detektion einer Bindung des Rezeptors an die Oberfläche stehen bekannte massensensitive und/oder optische Methoden zur Verfügung. Bevorzugt kommen optische Sensorverfahren, wie zum Beispiel die SPR-Spektroskopie oder die

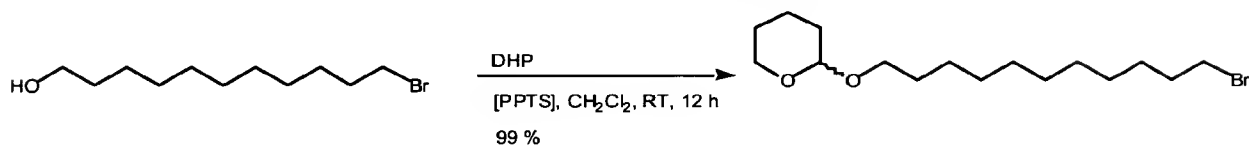
25 Chemolumineszenzmessung zum Einsatz.

Beispiele

Beispiel 1: 24,27,30,33-Tetraoxa-12-thia-tetratriacontansäure

5

1.1 (*rac*)-Tetrahydro-2-pyranyl-(11-brom-1-undecyl)ether



25.1 g (100 mmol) 11-Brom-1-undecanol, 12.6 g (150 mmol) Dihydropyran und 2.5 g (10 mmol) Pyridinium-*p*-toluolsulfonat wurden in 700 ml Dichlormethan für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Diethylether verdünnt und mit halbkonzentrierter Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels wurden 33.2 g (99 mmol, 99 %) DC-reines Produkt als gelbliches Öl erhalten.

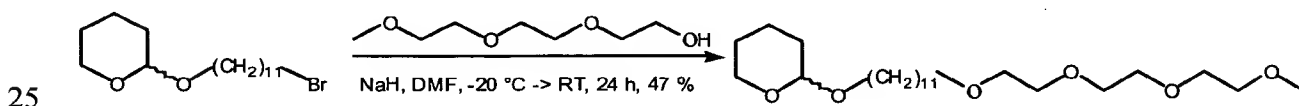
15

$R_f = 0.42$ (Kieselgel, *c*-Hexan/Essigsäureethylester = 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 303 K): $\delta = 4.56$ (t, 1H), 3.86 (dt, 1H), 3.72 (dt, 1H), 3.47 – 3.51 (m, 1H), 3.36 – 3.40 (m, 3H), 1.79 – 1.88 (m, 3H), 1.68 – 1.73 (m, 1H), 1.38 – 1.64 (m, 6H), 1.39 – 1.44 (m, 2H), 1.23 – 1.37 (m, 12H).

20

1.2 (*rac*)-Tetrahydro-2-pyranyl-(12,15,18,21-tetraoxa-1-docosyl)ether



25

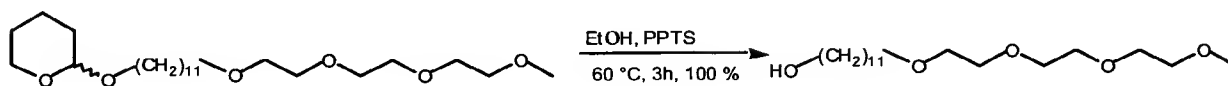
Unter Argon wurden zu einer auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlten Suspension von 1.84 g (76.5 mmol) Natriumhydrid in 150 ml *N,N*-Dimethylformamid eine Lösung von 12.6 g (76.5 mmol)

Triethylenglycolmonomethylether in 50 ml *N,N*-Dimethylformamid getropft. Nach 15 min Rühren bei -20 °C wurde eine Lösung von 25.2 g (75.0 mmol) (*rac*)-Tetrahydro-2-pyranyl-(11-brom-1-undecyl)ether in 50 ml *N,N*-Dimethylformamid innerhalb von 45 min zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde im Dewar-Gefäß über Nacht ohne weitere
5 Kühlung gerührt und erwärmte sich hierbei auf Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit 500 ml Dichlormethan aufgenommen. Nicht gelöste Salze wurden abfiltriert und die Lösung dreimal mit je 150 ml Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels wurde an 400 g Kieselgel mit *c*-
10 Hexan/Essigsäureethylester (4:1 → 2:1) chromatographiert. Es konnten 14.7 g (35.0 mmol, 47 %) DC-reines Produkt als gelbliches Öl isoliert werden.

$R_f = 0.37$ (Kieselgel, *c*-Hexan/Essigsäureethylester = 1:1)

15 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 303 K): δ = 4.53 (t, 1H), 3.86 (dt, 1H), 3.68 (dt, 1H), 3.59 – 3.64 (m, 8 H), 3.50 – 3.55 (m, 4H), 3.44 – 3.48 (m, 1H), 3.41 (t, 2H), 3.35 (dd, 1H), 1.76 – 1.85 (m, 1H), 1.63 – 1.70 (m, 1H), 1.45 – 1.58 (m, 8H), 1.22 – 1.34 (m, 14H).

20 1.3 12,15,18,21-Tetraoxa-1-docosanol

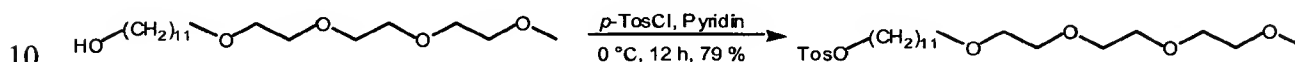


Es wurden 14.7 g (35.0 mmol) (*rac*)-Tetrahydro-2-pyranyl-(12,15,18,21-tetraoxa-1-
25 docosyl)ether in 300 ml Ethanol gelöst, mit 1 g (4 mmol) Pyridinium-*p*-toluolsulfonat
versetzt und bei 60 °C für 3 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle)
wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 300
ml Diethylether aufgenommen, der hierin unlösliche Katalysator wurde abfiltriert und
das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde in quantitativer
30 Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.14$ (Kieselgel, *c*-Hexan/Essigsäureethylester = 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 303 K): $\delta = 3.55 - 3.60$ (m, 8 H), 3.53 (t, 2H), 3.46 – 3.50 (m, 4H), 3.38 (t, 2H), 3.23 (s, 3H), 2.19 (bs, 1H), 1.44 – 1.52 (m, 4H), 1.19 – 1.29 (m, 14H).

1.4 12,15,18,21-Tetraoxa-1-docosyl-*p*-toluolsulfonsäureester

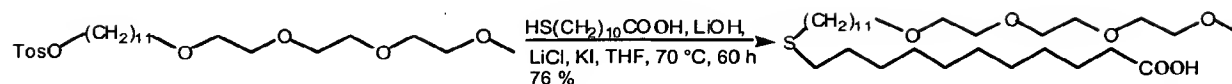


11.7 g (35.0 mmol) 12,15,18,21-Tetraoxa-1-docosanol wurden in 150 ml Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Hierzu wurden langsam 14.3 g (75.0 mmol) *p*-Toluolsulfonylchlorid gegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4 °C stehengelassen, wobei Pyridiniumchlorid in Form langer Nadeln ausfiel. Das Ende der Reaktion wurde mittels DC-Kontrolle ermittelt. Der gesamte Ansatz wurde unter Rühren auf 500 g Eis gegossen und anschließend mehrfach mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit kalter 1 M Salzsäure und dreimal mit kaltem Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Kaliumcarbonat/Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel auf ca. 50 ml eingeeengt und diese Lösung über 100 g Kieselgel mit Dichlormethan als Eluens filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden 13.5 g (27.6 mmol, 79 %) Produkt als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.39$ (Kieselgel, *c*-Hexan/Essigsäureethylester = 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 303 K): $\delta = 7.77$ (d, 2H), 7.32 (d, 2H), 4.00 (t, 2H), 3.51 – 3.68 (m, 12 H), 3.42 (t, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 1.59 – 1.65 (m, 2H), 1.51 – 1.59 (m, 2H), 1.19 – 1.31 (m, 14H).

1.5 24,27,30,33-Tetraoxa-12-thia-tetratriacontansäure

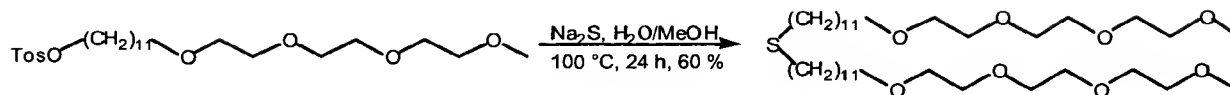


5 Es wurden 10.7 g (450 mmol) Lithiumhydroxid und 18.9 g (450 mmol) Lithiumchlorid in 450 ml Tetrahydrofuran suspendiert und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Hierzu wurden zuerst 17.6 g (80.6 mmol) 11-Mercaptoundecansäure gegeben und nach weiteren 15 min Rühren noch 18.0 g (110 mmol) Kaliumiodid. Zu diesem Gemisch wurden eine Lösung von 10.0 g (20.5 mmol) 12,15,18,21-Tetraoxa-1-docosyl-*p*-
10 toluolsulfonsäureester in 50 ml Tetrahydrofuran gegeben. Der Reaktionsansatz wurde unter DC-Kontrolle bis zum vollständigen Umsatz (ca. 60 h) unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit ca. 40 ml 32 %iger Salzsäure auf pH = 2 angesäuert. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit Dichlormethan aufgenommen und nicht gelöste Salze
15 abfiltriert. Das hierbei erhaltene Rohprodukt wurde auf 50 g Kieselgel aufgezogen und mit *c*-Hexan/Essigsäureethylester (1:1) an 500 g Kieselgel chromatographiert. Das erhaltene Produkt wurde nochmals aus *n*-Pentan umkristallisiert. Es wurden 9.09 g (15.5 mmol, 76 %) eines weißen, feinkristallinen Pulvers erhalten.

20 $R_f = 0.26$ (Kieselgel, *c*-Hexan/Essigsäureethylester = 2:3)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 303 K): δ = 3.63 – 3.67 (m, 8H), 3.54 – 3.59 (m, 4H), 3.45 (t, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.50 (t, 4H), 2.34 (t, 2H), 1.55 – 1.67 (m, 8H), 1.26 – 1.41 (m, 26H).

Beispiel 2: Bis-(12,15,18,21-tetraoxa-1-docosyl)sulfid



5 Es wurden 2.8 g (5.0 mmol) 12,15,18,21-Tetraoxa-1-docosyl-*p*-toluolsulfonsäureester und 680 mg (ca. 2.80 mmol) Natriumsulfid-Hydrat in einem Gemisch aus 40 ml Wasser und 20 ml Methanol für 24 h unter Rückfluß erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle) und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel

10 am Rotationsverdampfer entfernt. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt auf 15 g Kieselgel aufgezogen und mit *c*-Hexan/Essigsäureethylester (2:3) als Eluens an 180 g Kieselgel chromatographiert. Das erhaltene Produkt wurde nochmals aus *n*-Pentan bei – 20 °C umkristallisiert, wobei 950 mg (1.48 mmol, 60 %) reinweißes, kristallines Produkt erhalten wurden.

15

$R_f = 0.21$ (Kieselgel, *c*-Hexan/Essigsäureethylester = 2:3)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 303 K): $\delta = 3.62 - 3.66$ (m, 8H), 3.54 – 3.58 (m, 4H), 3.44 (t, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.49 (t, 2H), 1.53 – 1.60 (m, 4H), 1.26 – 1.40 (m, 14H).

20

Beispiel 3: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten (ALK) basierend auf Anker1

25

Die Synthese der ALK basierend auf Anker1 wurde in einer Polypropylen-Spritze mit einer Polypropylen-Fritte an TentaGel-RAM Harz[®] durchgeführt.

Standardzyklus für die Kupplung von N-Fmoc-geschützten Aminosäuren und von 24, 27,

30 30, 33-Tetraoxa-12-thia-tetratriacontansäure aus Beispiel 1:

Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurden 500 mg (0,24 mmol/g) TentaGel-RAM® Harz für 20 min mit 5 ml 20 % Piperidin in DMF geschüttelt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

- 5 5 Äquivalente der Fmoc-Aminosäure (0,48 mmol) und 5 Äquivalente (75 mg, 0,48 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt) wurden in 1,5 ml DMF gelöst und mit 5 Äquivalenten (72 µl, 0,48 mmol) N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt. Diese Lösung wurde zum Harz gegeben und die Suspension für 60 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

10

Synthese von Anker 1 (siehe Abb.1):

1a, 1b) Die Kupplung von Fmoc-Lys(Dde)-OH erfolgte analog dem Standardzyklus.

- 15 2a) Die Kupplung von 24,27,30,33-Tetraoxa-12-thia-tetratriacontansäure erfolgte analog dem Standardzyklus mit einer Kupplungszeit von 6 h.

2b) Für die Abspaltung der Dde-Schutzgruppe wurde das Harz viermal für jeweils 3 min mit 2,5 % Hydrazin in DMF inkubiert. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF
20 gewaschen.

3) Die Kupplung der Bernsteinsäure erfolgte durch Inkubation des Harzes mit 2/1/17 (w/v/v) Bernsteinsäureanhydrid/Pyridin/DMF für 60 min. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

25

4) Die Herstellung des Pentafluorphenyl-Esters (Pfp-Ester) erfolgte durch Inkubation des Harzes mit einer Lösung von 200 µl (1,16 mmol) Trifluoressigsäure-pentafluorphenylester und 100 µl (1,24 mmol) Pyridin in 500 µl DMF für 2 h. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

30

5) Die Kupplung von 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan erfolgte durch Inkubation des Harzes mit einer Lösung von 500 µl 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan und 50 mg

HOBt in 500 μ l DMF für 90 min. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

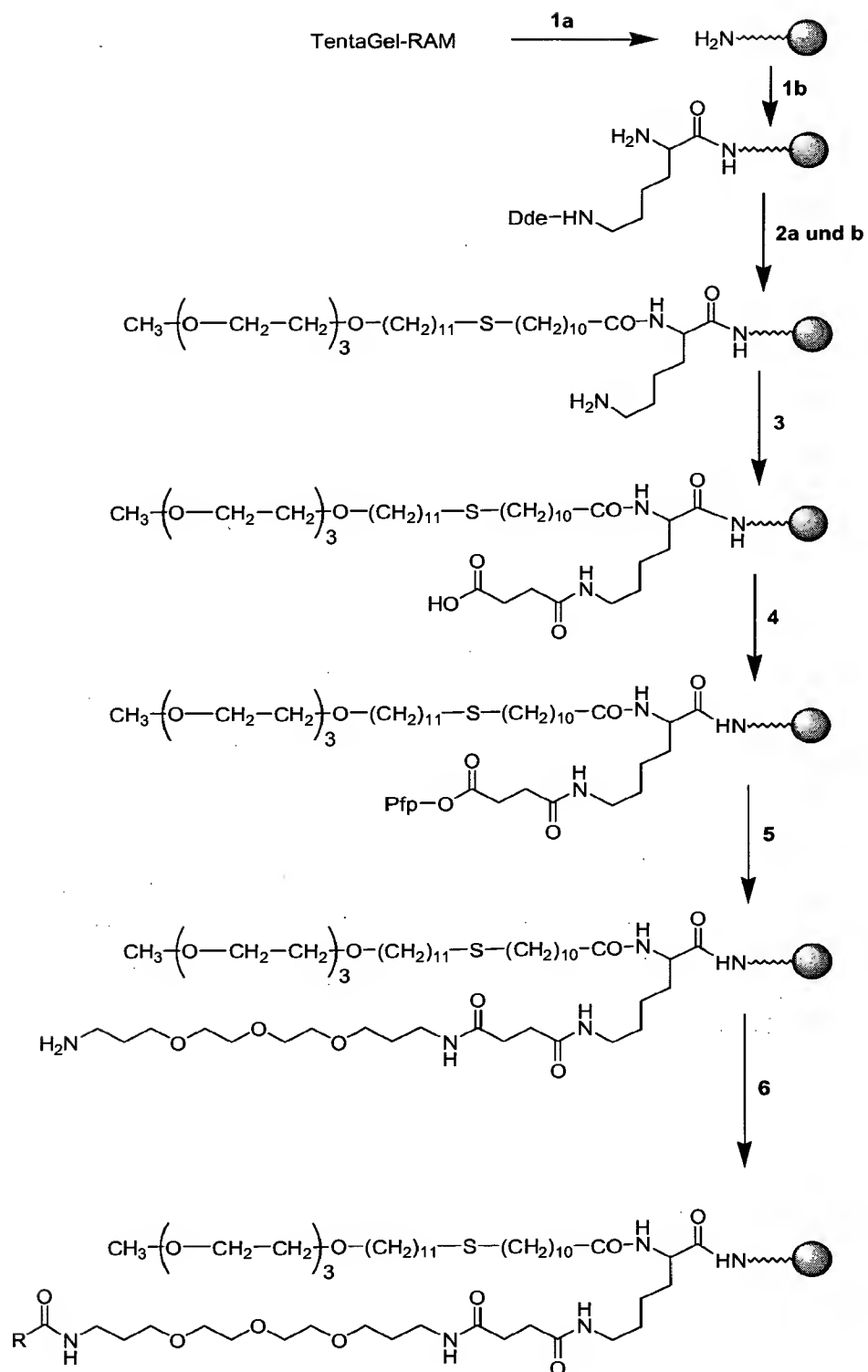
6) Kupplung der Liganden

5

a) Acetyl-Anker1

- 10 Die Amino-Gruppe des Anker1 wurde durch Inkubation von 50 mg Harz mit einer Lösung von 50 μ l Essigsäureanhydrid und 25 μ l Pyridin in 300 μ l DMF acetyliert. Anschließend wurde das ALK vom Harz abgespalten.

Abb. 1: Synthese von ALK basierend auf Anker1



Allgemeine Vorschrift für die Abspaltung des Anker-Ligand-Konjugats vom TentaGel-RAM Harz:

Nach erfolgter Synthese wurde das Harz (50 mg) fünfmal mit DMF und dreimal mit DCM gewaschen. Dann wurde das Harz für 2 h mit 1 ml 92/4/4 (v/v/v)

- 5 TFA/Triethylsilan/Wasser inkubiert und gelegentlich geschüttelt. Die Lösung wurde vom Harz abgetrennt und das Harz zweimal mit 250 µl TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden im Stickstoffstrom eingeblasen und der Rückstand durch RP-HPLC gereinigt.

- 10 Charakterisierung 6a):

ESI-MS (berechnet): $(M+H)^+$ 1007,1 (1006,7); $(M+2H)^{2+}$ 504,6 (504,2)

6b) Acetyl-O-Phospho-tyrosyl-Anker1

- 15 Fmoc-Tyr(PO_3H_2)-OH wurde analog der Standardvorschrift unter Zugabe von 2 Äquivalenten Ethyl-Diisopropylamin gekuppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde die freie Aminogruppe analog 6a) acetyliert. Die Abspaltung des ALK erfolgte analog der Standardvorschrift.

- 20 Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 625,6 (625,8)

6c) Acetyl-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Anker1

- 25 Die Kupplung der L-Aminosäuren erfolgte nach dem Standardzyklus unter Verwendung der folgenden Aminosäurederivate: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH. Die Acetylierung erfolgte analog 6a. Die Abspaltung des ALK erfolgte analog der Standardvorschrift.

- 30 Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 853,2 (853,1); $(M+3H)^{3+}$ 569,0 (569,1)

6d) Acetyl-(D-Phe)-Pro-Arg-Pro-Gly-Anker1

Die Kupplung der Aminosäuren erfolgte nach dem Standardzyklus. Die Acetylierung erfolgte analog 6a. Die Abspaltung des ALK vom Harz erfolgte nach der

5 Standardvorschrift.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 782,3 (781,6); $(M+2H+NH_4)^{3+}$ 527,1 (527,0)

10 6e) γ -Glu-Cys(StBu)-Gly-

Die Kupplung der Aminosäuren erfolgte nach dem Standardzyklus unter Verwendung der folgenden Aminosäurederivate: Fmoc-Glu(OH)-OtBu, Fmoc-Cys(StBu)-OH und Fmoc-Gly-OH. Die Abspaltung des ALK vom Harz erfolgte nach der

15 Standardvorschrift.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 672,0 (672,0)

20 Bei einem Derivat von 6e wurde vor der Abspaltung des ALK vom Harz die StBu-Schutzgruppe des Cysteins entfernt. Dazu wurde das Harz (50 mg) mit 1 ml 200 mM Dithiothreitol in 3/2 (v/v) Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,5/Acetonitril für 2 h unter Stickstoff geschüttelt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit Wasser und fünfmal mit DMF gewaschen. Die Abspaltung des ALK vom Harz erfolgte nach der

25 Standardvorschrift.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 627,8 (627,9)

30 6f) (2-Trimethylammonium-ethyl)-succinyl-Anker1 (Bernsteinsäure-Cholinester-Anker 1)

Die Kupplung der Bernsteinsäure erfolgte analog 3). Der Cholinester wurde durch Schütteln des Harzes (50 mg) mit einer Lösung von 100 mg (0,4 mmol) (2-Bromethyl)-trimethylammonium-bromid, 20 µl Ethyl-diisopropylamin in 1,2 ml DMSO für 5 h bei Raumtemperatur hergestellt. Die Abspaltung des ALK vom Harz erfolgte nach der

5 Standardvorschrift.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet:.) M^+ 1149,9 (1149,8); $(M+H)^{2+}$ 575,8 (575,8)

Beispiel 4: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten (ALK) basierend auf Anker2

Die Synthese der auf Anker2 basierenden ALK erfolgte bis Reaktionsschritt 2b aus

5 Beispiel 3 (Abb. 1) analog Anker1.

Das Syntheschema ist in Abbildung 2 dargestellt.

1) Die Kupplung von 3,6,9-Trioxaundecandisäure erfolgte durch Inkubation von 500 mg
 10 Harz mit 200 mg (0,9 mmol) Trioxaundecandisäure und 134 μ l (0,9 mmol) Diisopropylcarbodiimid in 2 ml DMF für 2 h. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

2) Die Herstellung des Pfp-Esters erfolgte analog Schritt 4) aus Beispiel 3.

15

3) Kupplung der Liganden

3a) 2-Acetamido-1-Amino-1,2-Dideoxy- β -D-Glucopyranosyl-Anker2

20 50 mg Harz wurden für 1 h mit einer Lösung von 20 mg (0,09 mmol) 2-Acetamido-1-Amino-1,2-Dideoxy- β -D-Glucopyranose, 14 mg (0,09 mmol) HOBt und 16 μ l (0,09 mmol) Ethyl-diisopropylamin in 300 μ l DMSO geschüttelt. Anschließend wurde das Harz dreimal mit DMSO und dreimal mit DMF gewaschen. Die Abspaltung des ALK vom Harz erfolgte analog der Standardvorschrift.

25

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+H)^+$ 1069,0 (1068,7); $(M+H+NH_4)^{2+}$ 543,8 (543,7)

30 3b) $N\alpha, N\alpha$ -bis(carboxymethyl)-L- ϵ Lys-Anker2

50 mg Harz wurden für 1 h mit einer Lösung von 23 mg (0,06 mmol) $N\alpha,N\alpha$ -bis(carboxymethyl)-L-Lysin-Trifluoressigsäure-Salz, 9,36 mg (0,06 mmol) HOBt und 52 μ l (0,3 mmol) Ethyldiisopropylamin in 500 μ l DMSO geschüttelt. Anschließend wurde das Harz dreimal mit DMSO und dreimal mit DMF gewaschen. Die Abspaltung des

5 ALK vom Harz erfolgte analog der Standardvorschrift.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+H)^+$ 1110,1 (1110,7); $(M+2H)^{2+}$ 556,2 (556,7)

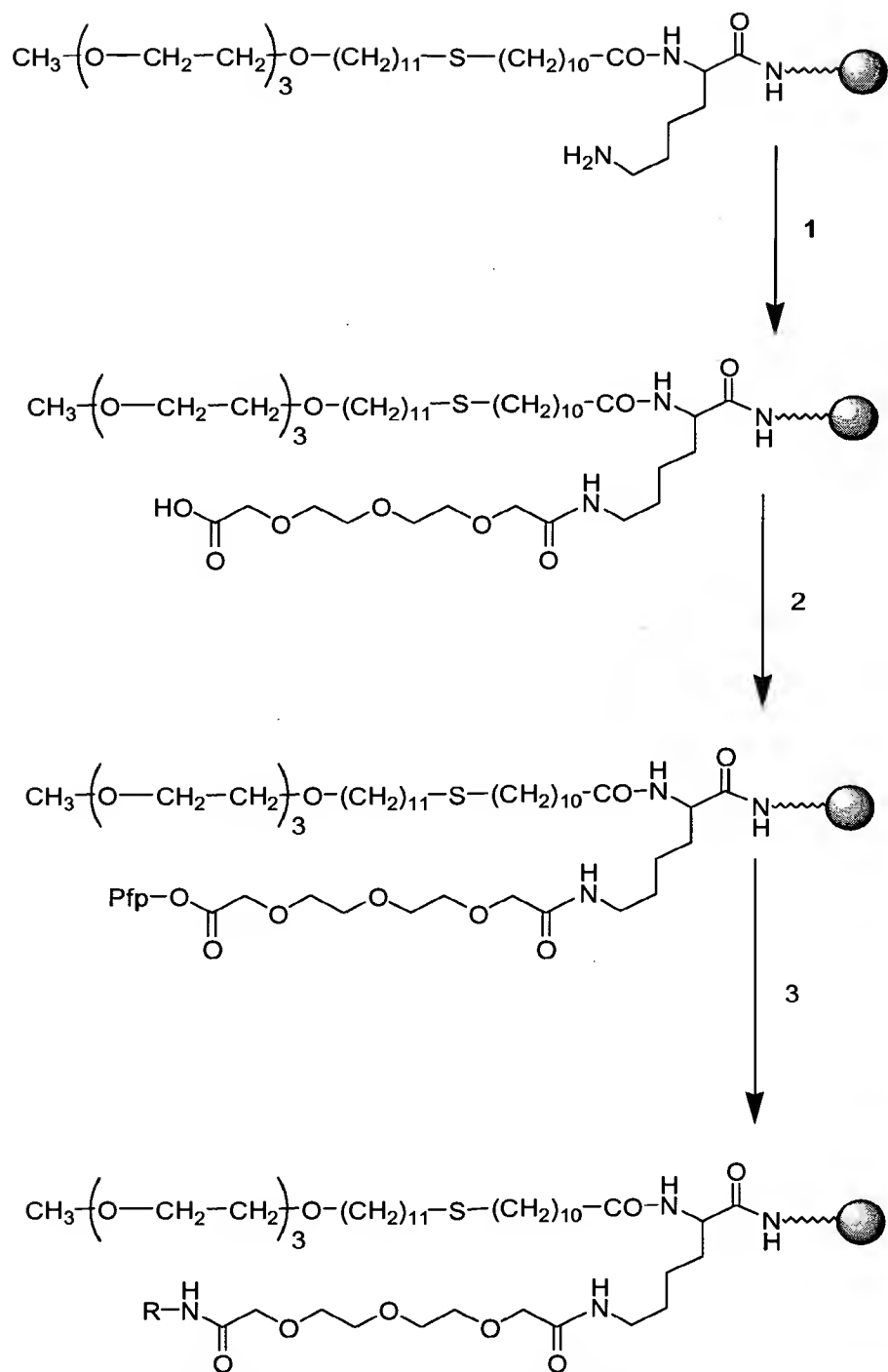


Abb. 2: Syntheschema der auf Anker2 basierenden ALK.

3c) N⁶-Aminohexyl-adenin-Anker2

N⁶-Aminohexyladenin wurde nach D.B. Craven et al., Eur. J. Biochem. (1974), 41, 329-
5 333 hergestellt und durch RP-HPLC gereinigt.

Die Kupplung von Aminohexyladenin erfolgte durch Inkubation des Harzes (40 mg) mit
5 mg (0,014 mmol) Aminohexyladenin-Trifluoressigsäure-Salz, 4 mg HOBt und 5 µl
DIEA in 200 µl DMF für 2 h. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF
10 gewaschen.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): (M+2H)²⁺ 542,2 (542,3)

15

3d) N⁶-Aminohexyl-adenosin-5'-monophosphat-Anker2

Die Synthese erfolgte analog 3c)

20 Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): (M+2H)²⁺ 648,2 (648,3)

Beispiel 5: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten (ALK) basierend auf Anker3

Die Synthese der auf Anker3 basierenden ALK erfolgte an TentaGel-NH₂[®] Harz.

5

1) Die Kupplung der Glykolsäure erfolgte durch Inkubation des Harzes (500 mg, 0,31 mmol/g) mit einer Lösung von 80 mg (1,05 mmol) Glykolsäure, 164 mg (1,05 mmol) HOBt und 157 µl DIC in 2 ml DMF für 30 min. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

10

2) Die Veresterung der Harz-gebundenen Glykolsäure mit Fmoc-Pro-OH erfolgte durch Inkubation des Harzes mit 210 mg (0,623 mmol) Fmoc-L-Pro-OH, 50 µl (0,63 mmol) N-Methylimidazol und 94 µl (0,63 mmol) DIC für 2 h. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen, die Fmoc-Gruppe abgespalten (Siehe Beispiel 3 -

15 Standardzyklus) und das Harz wiederum fünfmal mit DMF gewaschen.

3) Die Kupplung von Boc-L-Lys(Fmoc)-OH erfolgte nach dem Standardzyklus.

4) Die folgenden Schritte erfolgten analog der Synthese von Anker1 Schritt 1 bis 5.

20

5a) Acetyl-Anker3

Die Acetylierung erfolgte analog Schritt 6a aus Beispiel 3.

25

Allgemeine Vorschrift für die Abspaltung der ALK basierend auf Anker3 unter Bildung eines Diketopiperazins:

Das Harz (50 mg) mit den ALK wurde dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Zur

30 Abspaltung der N α -Boc-Schutzgruppe wurde das Harz für 30 min mit 2 ml 1/1 (v/v)

Trifluoressigsäure/Dichlormethan inkubiert. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit

Dichlormethan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Dann wurde das Harz einmal mit

Wasser gewaschen und anschließend für 12 h in 3/2 (v/v) 0,1 M NH_4HCO_3 /Acetonitril geschüttelt. Die Lösung wurde vom Harz abgetrennt und lyophilisiert. Das ALK wurde in 1/1 Wasser/Acetonitril aufgenommen und vor der HPLC-Reinigung mit Trifluoressigsäure angesäuert.

5

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$ 608,4 (608,4)

5b) Acetyl-O-Phosphotyrosyl-Anker3

10

Die Synthese erfolgte analog Schritt 6b) aus Beispiel 3.

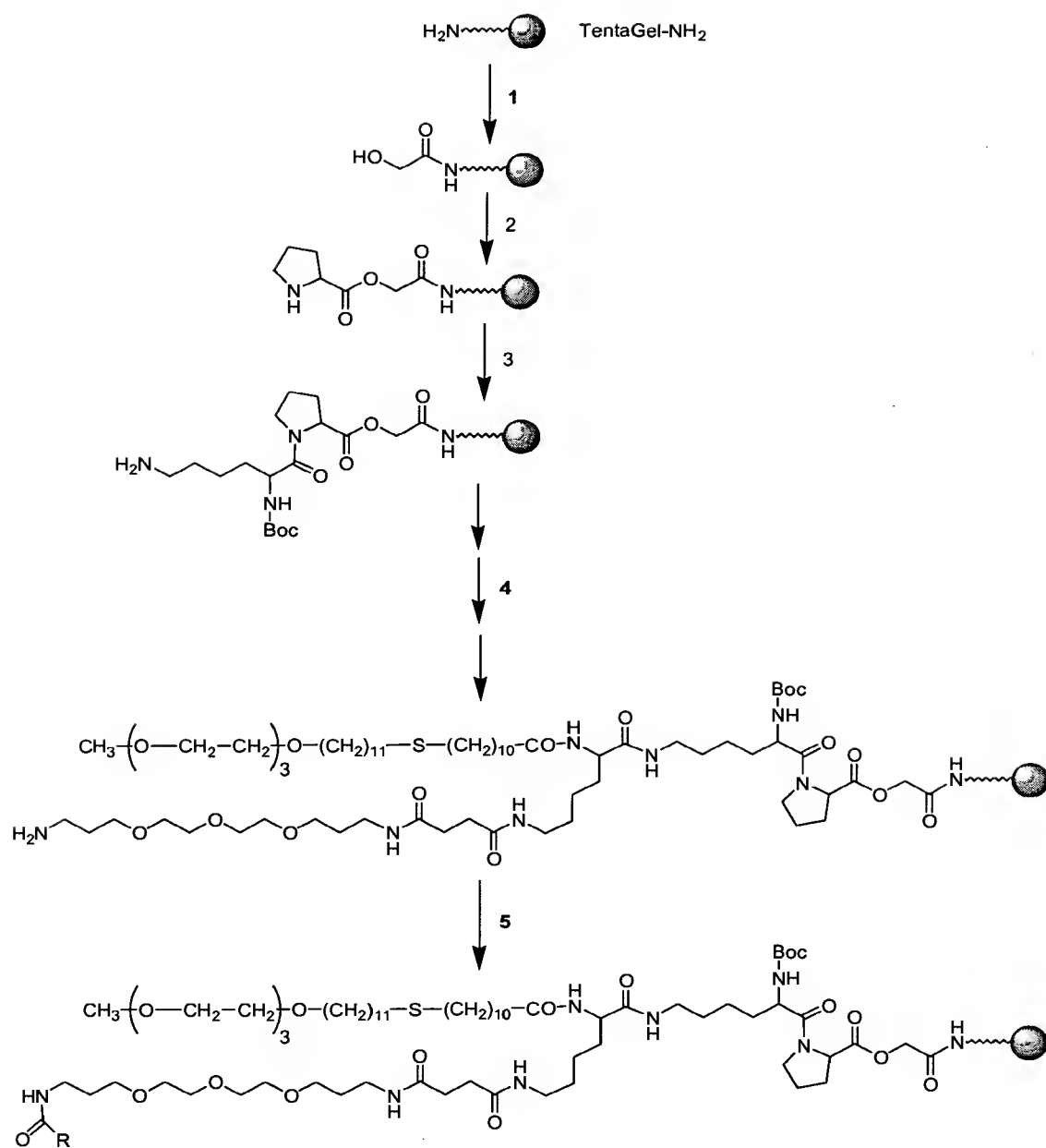
Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$ 730,0 (729,9)

15

Abb. 3 Synthese der auf Anker3 basierenden ALK.

20



Beispiel 6: Kombinatorische Synthese an Anker1

Als Beispiel für eine kombinatorische Synthese an Anker1 wurden 9 ALK aus der Kombination von drei Aminosäuren (Ser, Lys, Leu) mit drei Aminen (3-Amino-2,2-dimethyl-1-propanol = Amin1; (1S,2S)-2-Benzylloxycyclohexylamin = Amin2; (S)-3-Methyl-2-butylamin = Amin3), wie in Abb. 4 gezeigt, hergestellt.

1) Die Aminosäuren a) Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, b) Fmoc-L-Leu-OH und c) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH wurden an jeweils 90 mg Harz analog dem Standardzyklus gekuppelt und jeweils die Fmoc-Gruppe abgespalten.

2) Die Kupplung von Bromessigsäure erfolgte durch Inkubation der drei Harze mit jeweils 41,4 mg (0,3 mmol) Bromessigsäure und 45 μ l (0,3 mmol) DIC in 1 ml DMF für 30 min. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF und dreimal mit DMSO gewaschen.

3) Die drei Harze wurden jeweils in drei gleiche Portionen geteilt und die resultierenden neun Harzportionen wie in Abb. 4 gezeigt mit 300 μ l 2 M Lösungen der drei Amine a) 3-Amino-2,2-dimethyl-1-propanol = Amin1; b) (1S,2S)-2-Benzylloxycyclohexylamin = Amin2 und c) (S)-3-Methyl-2-butylamin = Amin3 in DMSO für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Harze jeweils fünfmal mit DMSO und dreimal mit DMF gewaschen. Die Abspaltung der ALK erfolgte nach der Standardvorschrift wie in Schritt 6a aus Beispiel 3 beschrieben.

25

Charakterisierung: ESI-MS (berechnet)

Amin1-Acetyl-Ser-Anker1: $(M+H)^+$ 1195,1 (1194,8); $(M+2H)^{2+}$ 598,6 (598,4)
 Amin2-Acetyl-Ser-Anker1: $(M+H)^+$ 1296,9 (1296,9); $(M+2H)^{2+}$ 649,7 (649,4)
 30 Amin3-Acetyl-Ser-Anker1: $(M+H)^+$ 1179,1 (1178,8); $(M+2H)^{2+}$ 590,6 (590,4)
 Amin1-Acetyl-Leu-Anker1: $(M+H)^+$ 1221,2 (1220,9); $(M+2H)^{2+}$ 611,7 (611,4)
 Amin2-Acetyl-Leu-Anker1: $(M+H)^+$ 1322,8 (1322,9); $(M+2H)^{2+}$ 662,7 (662,5)

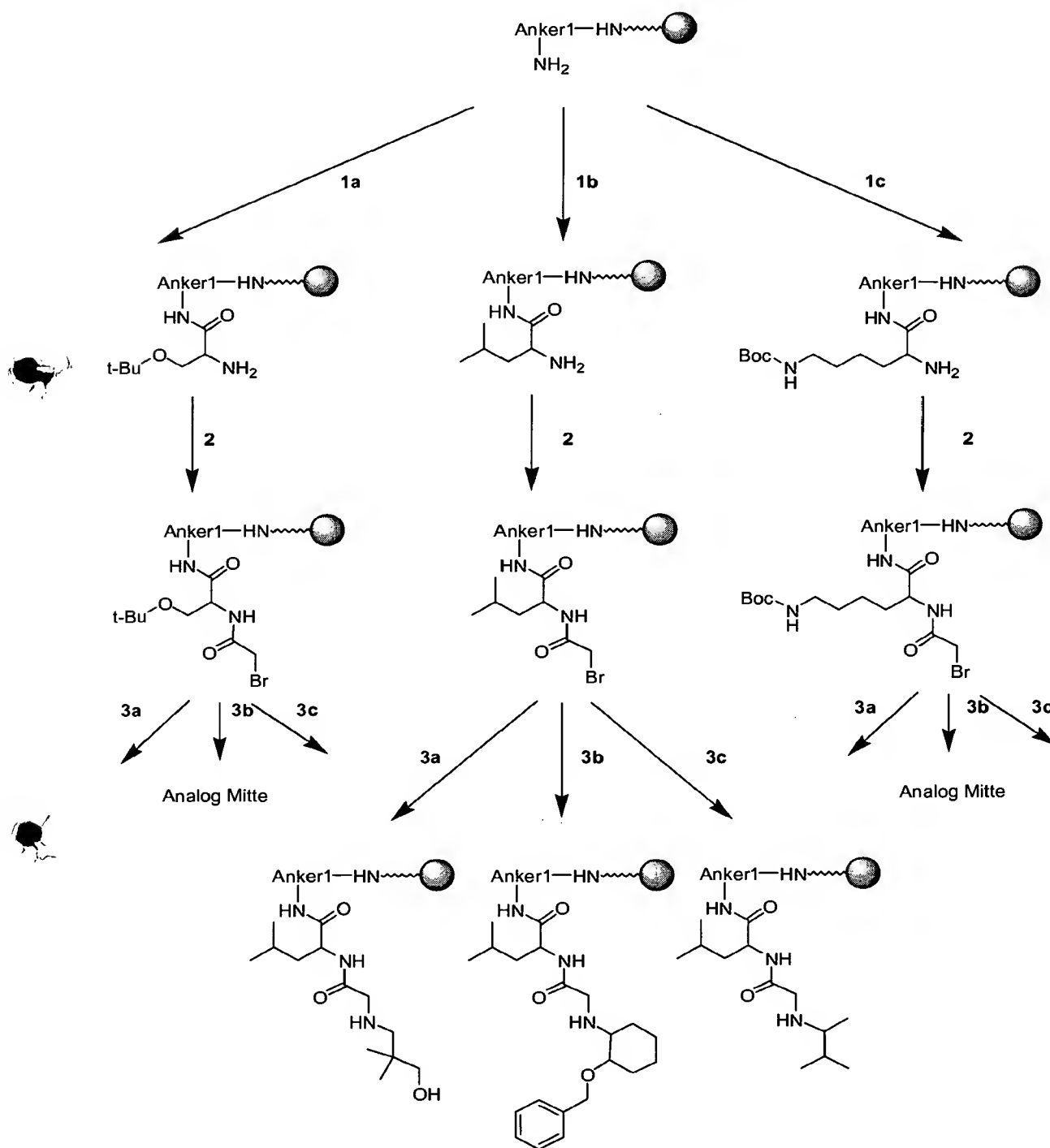
Amin3-Acetyl-Leu-Anker1: $(M+H)^+$ 1205,2 (1204,9); $(M+2H)^{2+}$ 603,6 (603,4)

Amin1-Acetyl-Lys-Anker1: $(M+H)^+$ 1236,2 (1235,9); $(M+2H)^{2+}$ 619,2 (618,9)

Amin2-Acetyl-Lys-Anker1: $(M+H)^+$ 1337,9 (1337,9); $(M+2H)^{2+}$ 670,3 (670,0)

Amin3-Acetyl-Lys-Anker1: $(M+H)^+$ 1220,3 (1219,9); $(M+2H)^{2+}$ 611,2 (610,9)

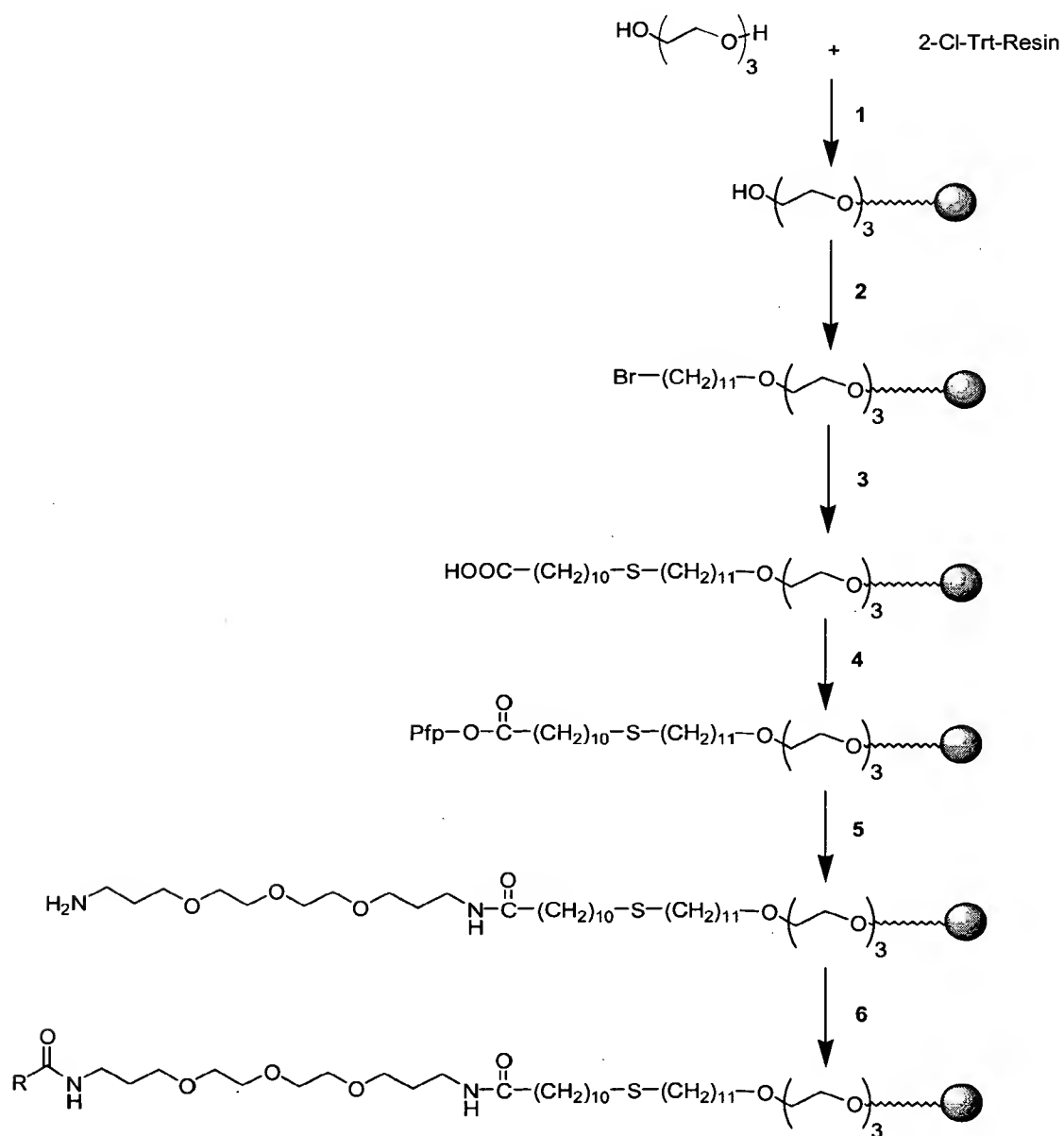
Abb. 4: Syntheschema für die kombinatorische Synthese an Anker1



Beispiel 7: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten basierend auf Anker6

Abb. 5: Syntheschema für auf Anker6 basierende ALK

5



Die Synthese der ALK basierend auf Anker6 erfolgte an 2-Chlortrityl-chlorid Harz (Abb.5).

1) 500 mg (1,35 mmol/g) des 2-Chlortrityl-chlorid-Harzes wurden in einem Rundkolben mit Rückflußkühler in 500 mg (3,33 mmol) Triethylenglykol und 540 μ l (6,67 mmol) Pyridin in 5 ml Tetrahydrofuran suspendiert und für 6 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde das Harz in eine Fritte überführt und fünfmal mit Tetrahydrofuran gewaschen.

2) 318 μ l (1,35 mmol) 1,11-Dibromundecan wurden in 3 ml Tetrahydrofuran gelöst und 142 mg (0,54 mmol) 18-Krone-6 und 30 mg (0,54 mmol) KOH zugegeben. 200 mg Harz wurden zugegeben und die Suspension für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit Tetrahydrofuran, fünfmal mit Wasser, dreimal mit DMF und dreimal mit Tetrahydrofuran gewaschen.

3) 235 mg (1,08 mmol) 11-Mercaptoundecansäure wurde in 4 ml Tetrahydrofuran gelöst und 78 mg (3,24 mmol) LiOH, 137,4 mg (3,24) LiCl und 170 mg (1,02 mmol) KI zugegeben. Nach Zugabe des Harzes wurde die Suspension für 16 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit Tetrahydrofuran, fünfmal mit Wasser, dreimal mit DMF, dreimal mit Dichlormethan, zweimal mit Hexan gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4) Die Aktivierung der Carbonsäure unter Ausbildung des Pentafluorphenylesters erfolgte analog Schritt 4) aus Beispiel 3.

5) Die Kupplung von 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan erfolgte analog Schritt 5) aus Beispiel 3.

6) Die Acetylierung erfolgte analog Schritt 6a) aus Beispiel 3.

Allgemeine Vorschrift für die Abspaltung des ALK vom 2-Chlortrityl-Harz:
Das Harz wurde fünfmal mit Dichlormethan gewaschen und anschließend mit 1 ml / (100 mg Harz) 46/46/4/4 (v/v/v/v) Trifluoressigsäure/Dichlormethan/Wasser/Triethylsilan für

20 min inkubiert. Die Lösung wurde vom Harz abgetrennt und das Harz zweimal mit der Abspalllösung gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden zur Trockene eingengt und der Rückstand durch HPLC gereinigt.

5 Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+H)^+$ 765,8 (765,6)

Beispiel 8: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten basierend auf Anker7

Das Syntheschema für ALK basierend auf Anker7 ist in Abbildung 6 gezeigt.

5

1a) Die Beladung des 2-Chlortrityl-chlorid-Harzes mit 1,10-Decandiol erfolgte analog Schritt 1) aus Beispiel 7.

2) Die freie Hydroxylgruppe wurde durch Inkubation von 500 mg Harz mit 515 mg (2,7 mmol) p-Toluolsulfonylchlorid und 425 μ l (5,4 mmol) Pyridin in 4 ml DCM tosyliert. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit Dichlormethan und dreimal mit Tetrahydrofuran gewaschen.

10

Die folgenden Schritte erfolgten analog Schritte 3) bis 6) aus Beispiel 7.

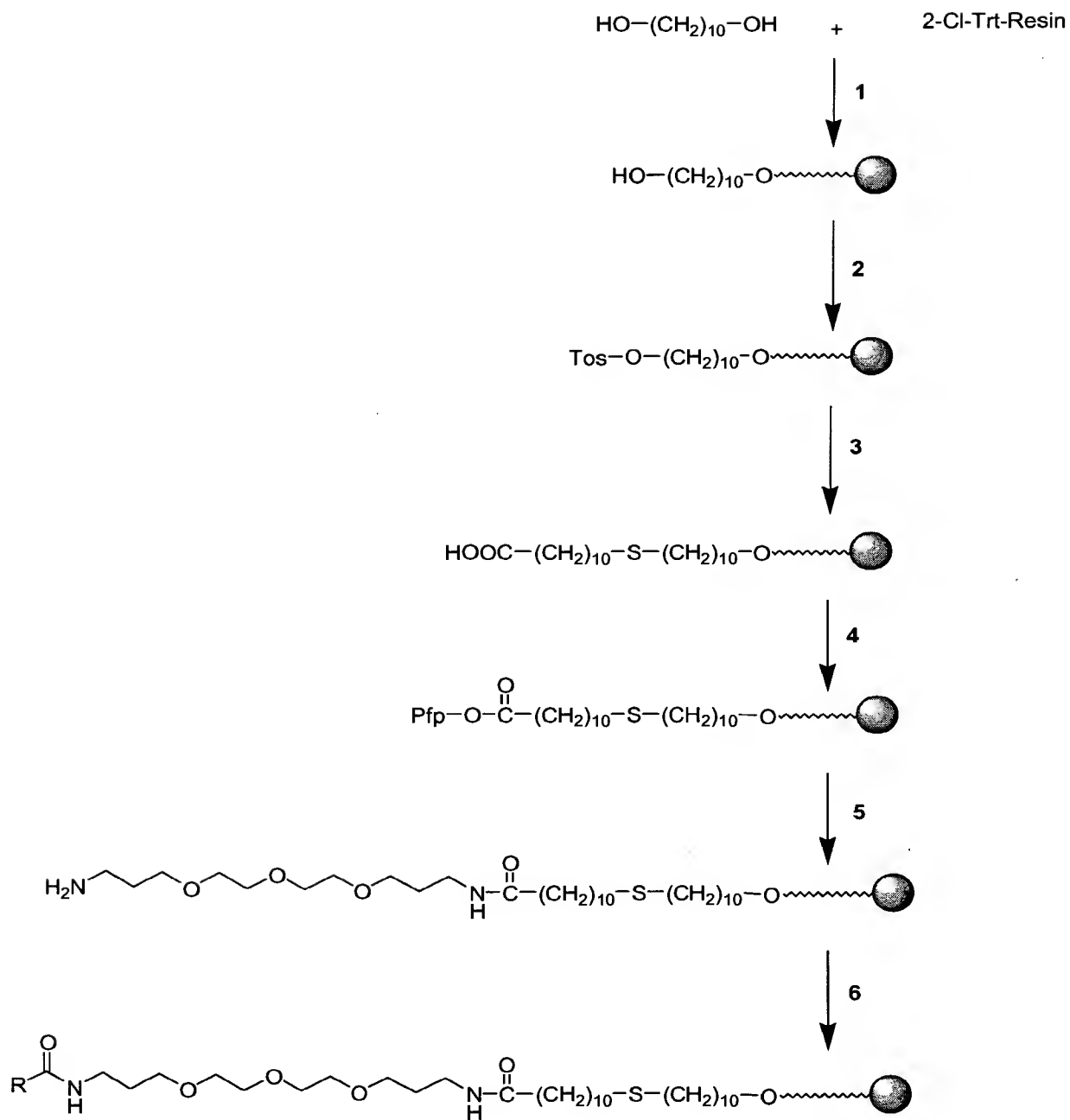
15

Charakterisierung:

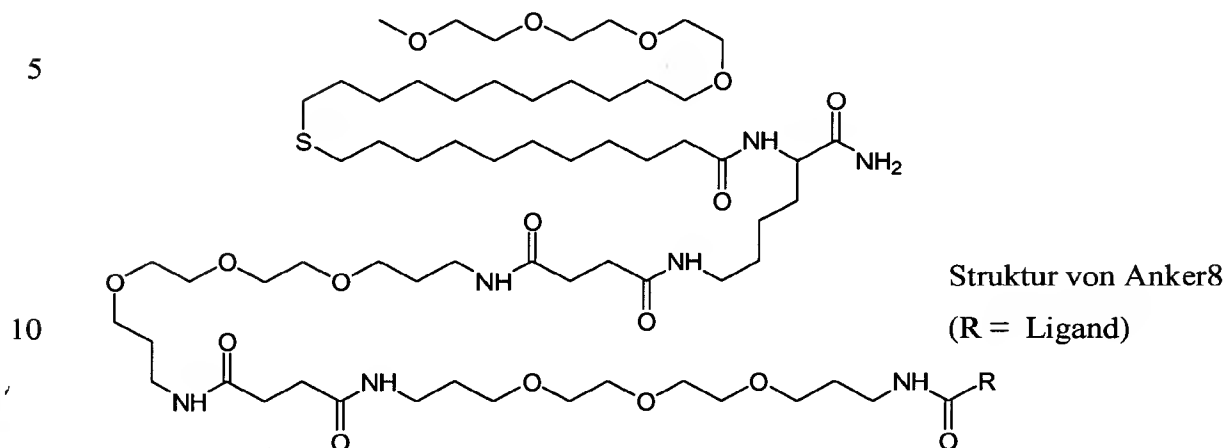
ESI-MS (berechnet): $(M+H)^+$ 619,8 (619,5)

20

Abb. 6: Syntheschema für auf Anker7 basierende ALK.



Beispiel 9: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten basierend auf Anker8



15

20

Die Synthese der ALK basierend auf Anker8 wurde in einer Polypropylen-Spritze mit einer Polypropylen-Fritte an TentaGel-RAM Harz[®] durchgeführt.

25 Standardzyklus für die Kupplung von N-Fmoc-geschützten Aminosäuren und von 24, 27, 30, 33-Tetraoxa-12-thia-tetratriacontansäure aus Beispiel 1.

Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurden 50 mg TentaGel-RAM[®] (0,24 mmol/g) Harz für 20 min mit 0,5 ml 20 % Piperidin in DMF geschüttelt. Anschließend wurde das Harz

30 fünfmal mit DMF gewaschen.

5 Äquivalente der Fmoc-Aminosäure (0,06 mmol) und 5 Äquivalente (9 mg, 0,06 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt) wurden in 0,15 ml DMF gelöst und mit 5 Äquivalenten (11 µl, 0,07 mmol) N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt. Diese Lösung wurde zum Harz gegeben und die Suspension für 60 min
5 geschüttelt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

Synthese von Anker8 (analog der Synthese von Anker1):

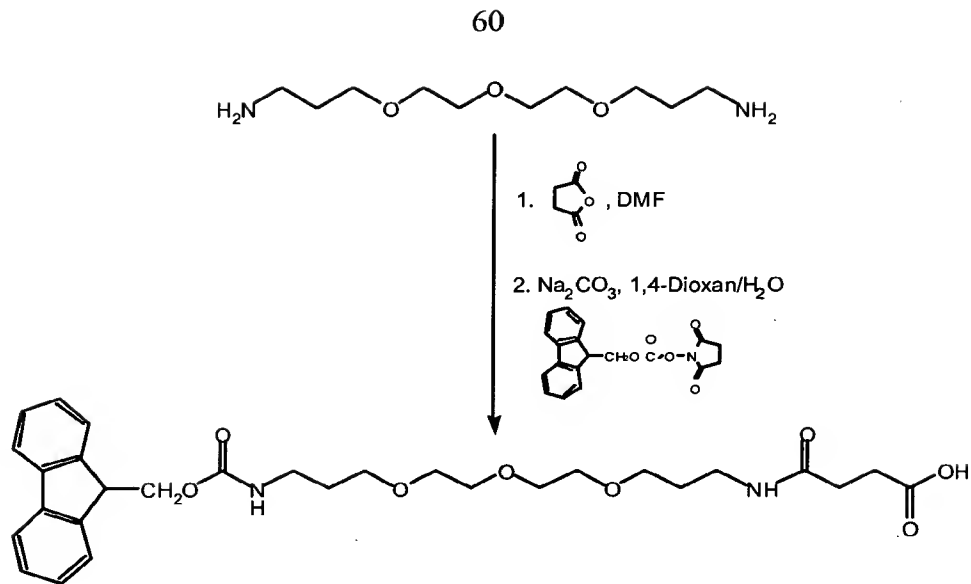
Die Kupplung von Fmoc-Lys(Dde)-OH erfolgte analog dem Standardzyklus.

10

Nach Fmoc-Abspaltung erfolgte die Kupplung von 24,27,30,33-Tetraoxa-12-thia-tetratriacontansäure entsprechend dem Standardzyklus mit einer Kupplungszeit von 6 h.

Für die Abspaltung der Dde-Schutzgruppe wurde das Harz viermal für jeweils 3 min mit
15 2,5 % Hydrazin in DMF inkubiert. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

Nach der Dde-Abspaltung wurde N-Fluorenylmethoxycarbonyl-N'Succinyl-4,7,10-Trioxatridecan-1,13-diamin (Fmoc-Std-OH), das in Lösung unter Verwendung von
20 Bernsteinsäureanhydrid, 4,7,10-Trioxa-1,13-diaminotridecan und 9-Fluorenylmethoxyloxycarbonyl-N-hydroxysuccinimid hergestellt wurde (siehe nachfolgende Abb.), entsprechend dem Standardzyklus für Fmoc-Aminosäuren gekuppelt (2 h). Nach Fmoc-Abspaltung wurde diese Kupplung wiederholt.



5

Kupplung der Liganden

a) Acetyl-Anker8

10

Die Amino-Gruppe des Anker8 wurde durch Inkubation von 50 mg Harz mit einer Lösung von 50 μ l Essigsäureanhydrid und 25 μ l Pyridin in 300 μ l DMF acetyliert. Anschließend wurde das ALK vom Harz abgespalten.

15 Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 655,0 (655,6)

b) Acetyl-O-Phospho-tyrosyl-Anker8

- 20 Fmoc-Tyr(PO_3H_2)-OH wurde analog der Standardvorschrift unter Zugabe von 2 Äquivalenten Ethyl-Diisopropylamin gekuppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde die freie Aminogruppe analog a) acetyliert. Die Abspaltung des ALK erfolgte analog der Standardvorschrift.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 776,9 (776,5)

5

c) Acetyl-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Anker8

Die Kupplung der L-Aminosäuren erfolgte nach dem Standardzyklus unter Verwendung der folgenden Aminosäurederivate: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-

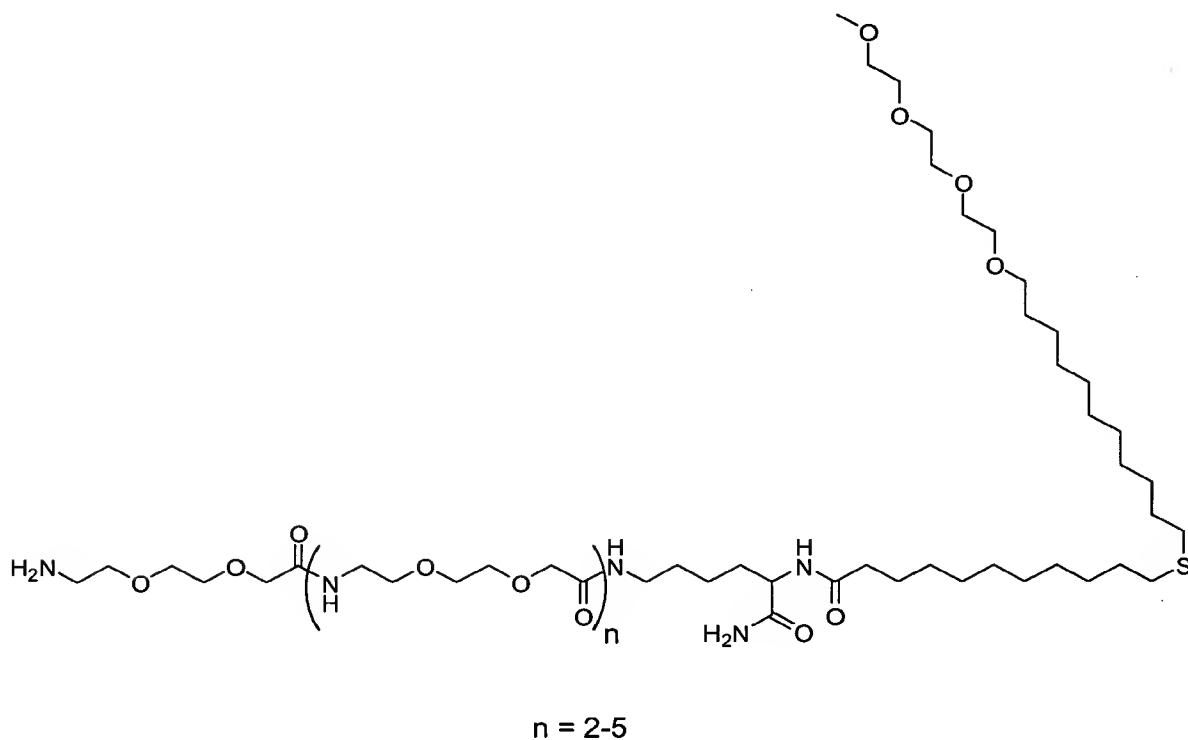
10 Asp(OtBu)-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH. Die Acetylierung erfolgte analog a). Die Abspaltung des ALK erfolgte analog der Standardvorschrift.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 892,1 (892,1)

15

Beispiel 10: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten basierend auf Anker9



10 Synthese von Anker9-1 (n=2) bis 9-4 (n=5):

Die Synthese der Anker9-1 bis 9-4 erfolgte analog der Synthese von Anker8 mit dem einzigen Unterschied, daß anstelle der zwei aufeinanderfolgenden Fmoc-Std-OH Kupplungen (n + 1) aufeinanderfolgende Kupplungen von Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctansäure (Neosystem, Strasbourg) erfolgten.

4) Kupplung der Liganden

a) Acetyl-Anker9-1

Die Amino-Gruppe des Anker9-1 wurde durch Inkubation von 50 mg Harz mit einer Lösung von 50 µl Essigsäureanhydrid und 25 µl Pyridin in 300 µl DMF acetyliert. Anschließend wurde das ALK nach Standardvorschrift vom Harz abgespalten.

5 Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 570,9 (570,4)

b) Acetyl-O-Phospho-tyrosyl-Anker9-1

- 10 Fmoc-Tyr(PO_3H_2)-OH wurde analog der Standardvorschrift unter Zugabe von 2 Äquivalenten Ethyl-Diisopropylamin gekuppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde die freie Aminogruppe analog a) acetyliert. Die Abspaltung des ALK erfolgte analog der Standardvorschrift.

15 Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 692,2 (691,9)

c) Acetyl-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Anker9-1

20

Die Kupplung der L-Aminosäuren erfolgte nach dem Standardzyklus unter Verwendung der folgenden Aminosäurederivate: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH. Die Acetylierung erfolgte analog a). Die Abspaltung des ALK erfolgte analog der Standardvorschrift.

25

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 807,1 (806,5)

d) Acetyl-Anker9-2

30

Die Acetylierung erfolgte analog a). Die Abspaltung vom Harz erfolgte analog der Standardvorschrift.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 643,9 (642,9)

5 e) Acetyl-Anker9-3

Die Acetylierung erfolgte analog a). Die Abspaltung vom Harz erfolgte analog der Standardvorschrift.

10 Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 715,6 (715,5)

f) Acetyl-Anker9-4

15 Die Acetylierung erfolgte analog a). Die Abspaltung vom Harz erfolgte analog der Standardvorschrift.

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 789,5 (788,0)

Beispiel 11: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten basierend auf Anker11 (Thiolanker)

5

Die Synthese der ALK basierend auf Anker11 erfolgte bis Schritt 1b und ab Schritt 2b in nachfolgender Abbildung analog den Syntheseschritten 1a bis 1b und 2b bis 6b in Beispiel 3.

10 2a) Die Kupplung von S-Mmt-11-Mercaptoundecansäure erfolgte analog dem Standardzyklus aus Beispiel 3.

11-Mercaptoundecansäure wurde mit der Mmt-Schutzgruppe analog M. Bodanszky, A. Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin, 2. Auflage, 1994, S.68 geschützt.

15

6a) Acetyl-Anker11

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+H)^+$ 690,7 (690,4).

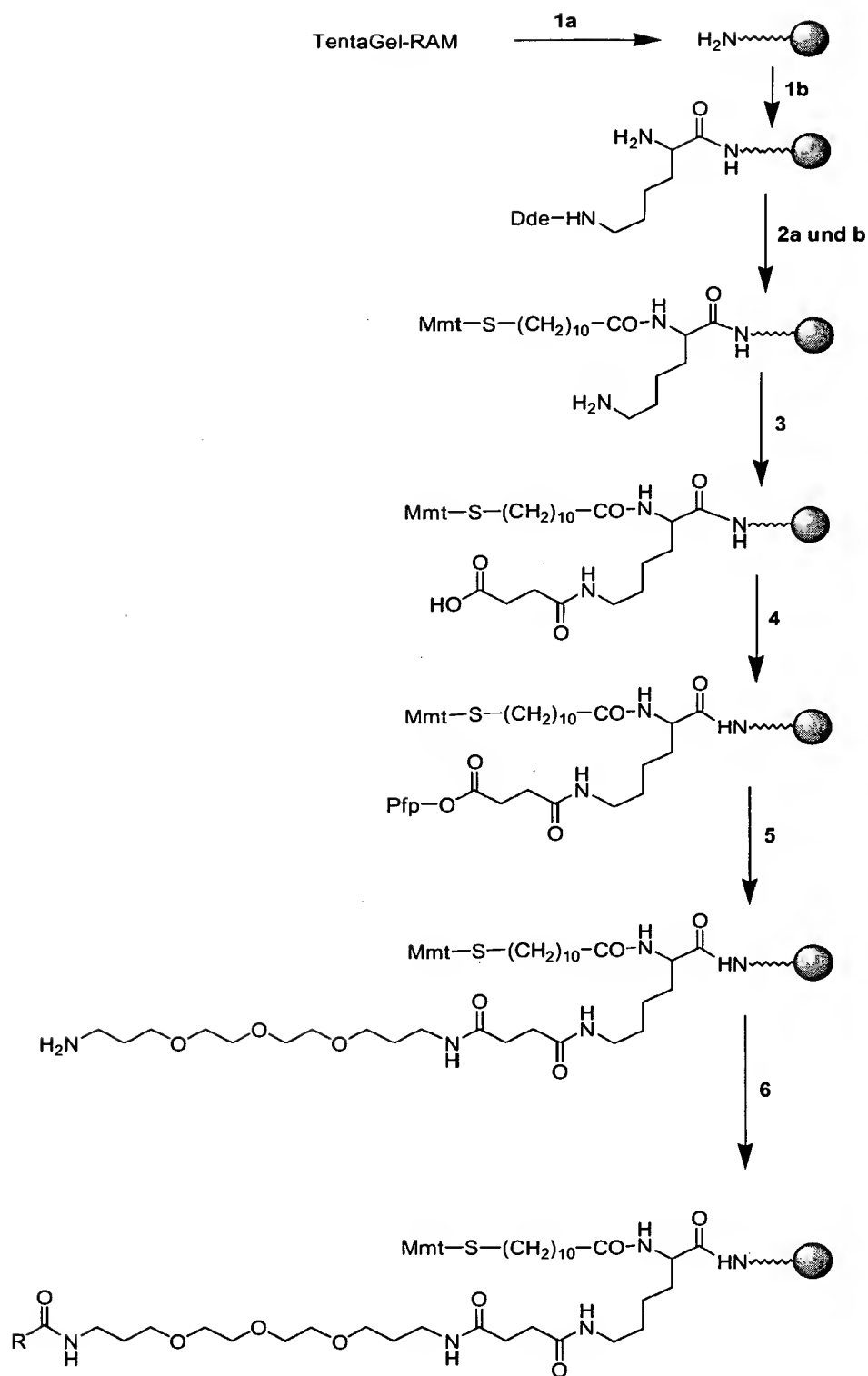
20

6b) Acetyl-O-Phospho-tyrosyl-Anker11

Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+H)^+$ 933,8 (933,5).

25



Beispiel 12: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten basierend auf Anker12

5 Synthese von Anker12:

Die Synthese von Anker12 erfolgte analog der Synthese von Anker10 bis zur 2. Kupplung von Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctansäure. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde 3,6,9-Trioxaundecandisäure gekuppelt. Dies erfolgte durch

10 Inkubation von 100 mg Harz mit 30 mg 3,6,9-Trioxaundecandisäure, 23 μ l Diisopropylcarbodiimid und 25 μ l Ethyl-diisopropylamin in 300 μ l DMF für 90 min. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

2,4-Diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridin - Anker12

15

Die freie Carboxylat-Gruppe wurde analog Beispiel 3, 4) in den Pfp-Ester überführt. Die Kupplung des Liganden erfolgte durch Schütteln von 50 mg Harz mit 12 mg 2,4-Diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridin, 15 μ l N-Methylimidazol in 250 μ l DMF für 2 h bei Raumtemperatur. Die Abspaltung des Ligand-Anker-Konjugats erfolgte analog der

20 Standardvorschrift.

Charakterisierung:

25 LC-MS (erwartet): $[M+2]^{2+}$ 666,6 (666,4)

Beispiel 13: Synthese des Ankers13 als Verdünnerkomponente

30

Die Synthese der ALK wurde in einer Polypropylen-Spritze mit einer Polypropylen-Fritte an 50mg (0,26mmol/g) TentaGel-RAM® Harz durchgeführt.

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe und die Kupplung von Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctansäure erfolgten dem Standardzyklus (siehe Beispiel 3).

- 5 Die Kupplung von 24,27,30,33-Tetraoxa-12-thia-tetratriacontansäure erfolgte analog dem Standardzyklus mit einer Kupplungszeit von 90 Minuten.

Die Abspaltung des Ankers erfolgte analog der Standardvorschrift zur Abspaltung von LAK (siehe Beispiel 3).

10

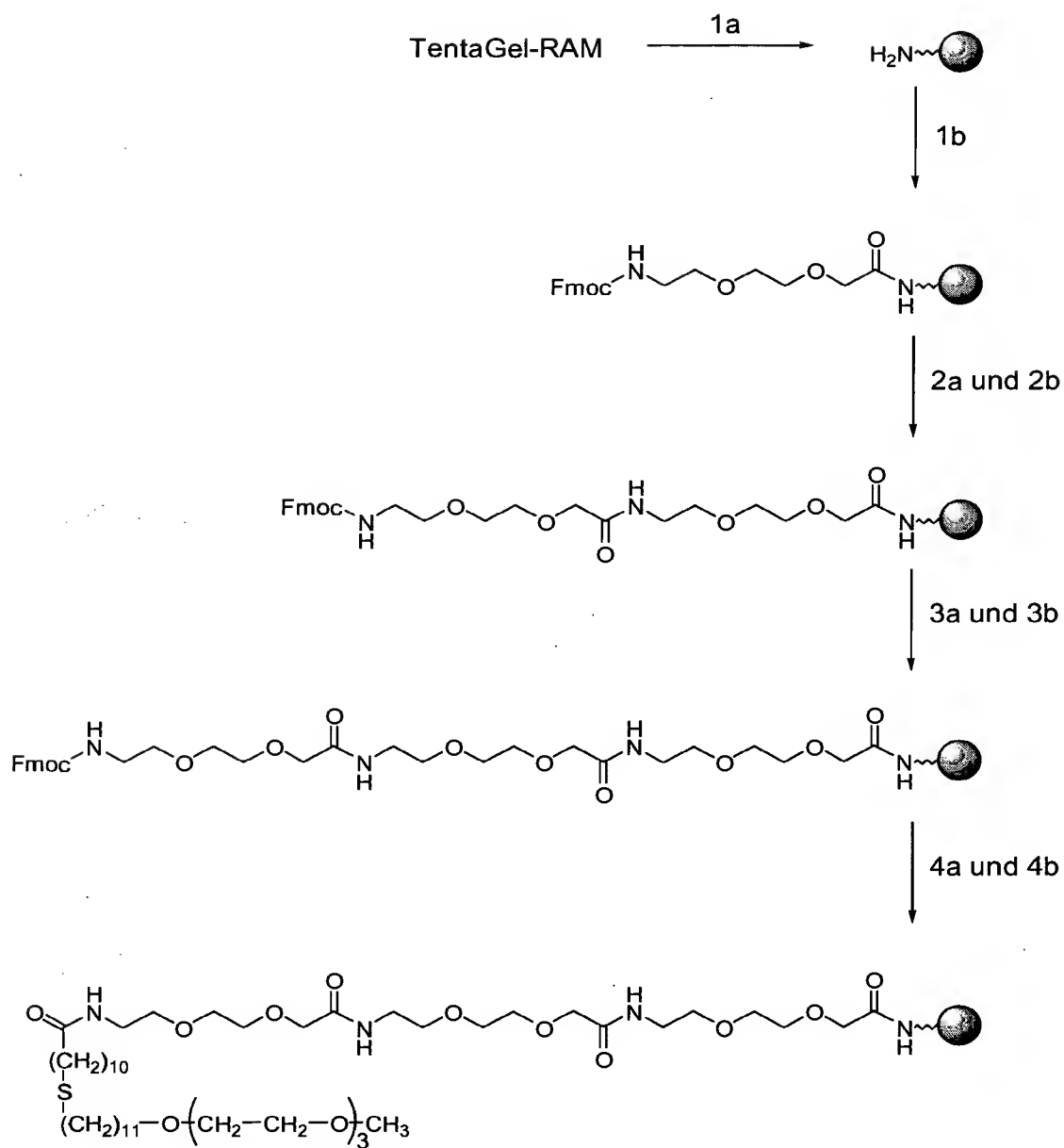


Charakterisierung:

ESI-MS (berechnet): $(M+H)^+$ 969,8 (968,6)



Schema zur Synthese von Anker13:



Beispiel 14: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten basierend auf Anker14

Die Synthese der ALK wurde in einer Polypropylen-Spritze mit einer Polypropylen-
5 Fritte an 100mg (0,26mmol/g) TentaGel-RAM® Harz durchgeführt.

1a) Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte analog dem Standardzyklus (siehe Beispiel 3).

10 1b) Die Kupplung von Fmoc-Lys(Dde)-OH und von 24,27,30,33-Tetraoxa-12-thia-tetratriacontansäure erfolgte ebenfalls analog den Standardvorschriften (siehe Beispiel 3) mit einer Kupplungszeit von 90min. Für die Kupplung von Fmoc-Lys(Dde)-OH wurden noch zusätzlich 5 Äquivalente 1-Hydroxy-1H-benzotriazol hinzugegeben.

15 2) Für die Abspaltung der Dde-Schutzgruppe wurde das Harz viermal für jeweils 3min mit 2% Hydrazin in DMF inkubiert. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

3) 6 Äquivalente der 4-Aminobenzoesäure (0,156mmol) und 6 Äquivalente (24mg,
20 0,156mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt) wurden in 500µl DMF gelöst und mit 6 Äquivalenten (25µl, 0,156mmol) N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt. Diese Lösung wurde zum Harz gegeben und die Suspension für 90min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz zweimal mit DMF gewaschen und die Kupplung wurde einmal wiederholt.

25 Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

4) Die Kupplung der Bernsteinsäure erfolgte durch Inkubation des Harzes mit 5 Äquivalenten Bernsteinsäureanhydrid und mit 5 Äquivalenten HOBt in 750µl DMF über Nacht. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

30

5) Für die Kupplung von 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan wurde zuerst das Pentafluorphenyl-Ester hergestellt. Dies erfolgte durch Inkubation des Harzes mit einer

Lösung von 200µl (1,16mmol) Trifluoressigsäure-pentafluorphenylester und 100µl (1,24mmol) Pyridin in 500µl DMF für 2 h. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

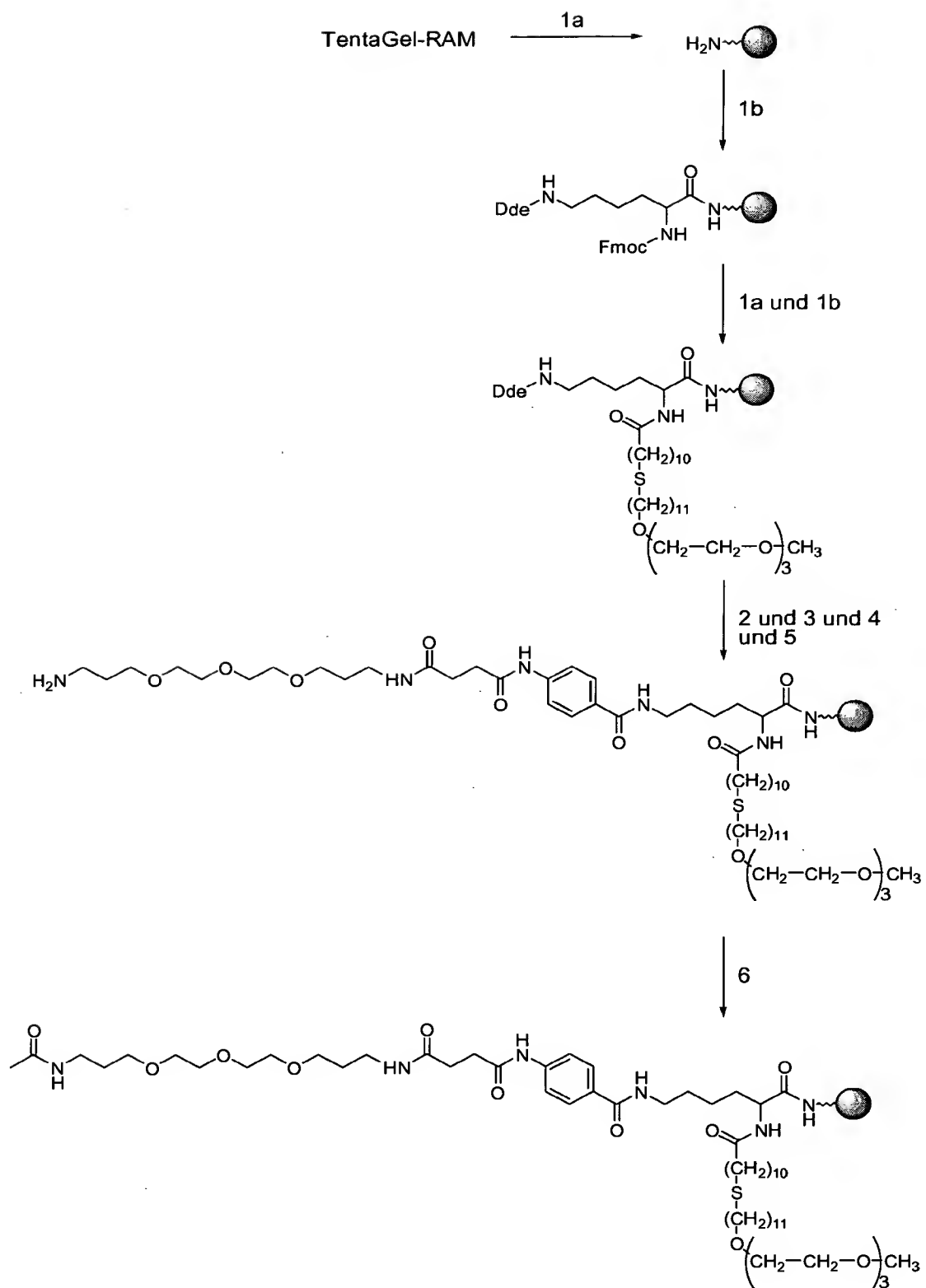
- Die Kupplung von 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan erfolgte durch Inkubation des
- 5 Harzes mit einer Lösung von 500µl 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan und 50mg HOBt in 500µl DMF über Nacht. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

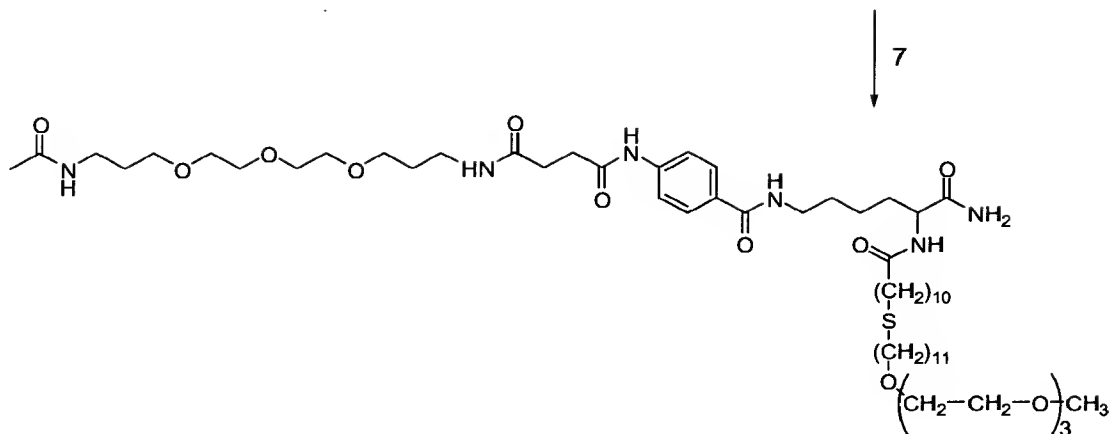
- 6) Die Amino-Gruppe von 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan wurde durch Inkubation des Harzes mit einer Lösung von 50µl Essigsäureanhydrid und 100µl Pyridin in 150µl
- 10 DMF acetyliert.

- 7) Die Abspaltung des ALK erfolgte analog der Standardvorschrift (siehe Beispiel 3).

Charakterisierung:

- 15 ESI-MS (berechnet): $(M+2H)^{2+}$ 564,2 (563,8)





Beispiel 15: Synthese von Anker-Ligand-Konjugaten basierend auf Anker 15

Die Synthese der ALK wurde in einer Polypropylen-Spritze mit einer Polypropylen-Fritte an 200mg (0,25mmol/g) TentaGel-NH₂® Harz durchgeführt.

1) Die Kupplung der Glykolsäure erfolgte durch Inkubation des Harzes mit einer Lösung von 20mg (0,25mmol) Glykolsäure, 39mg (0,25mmol) HOBt und 40µl DIC in 750µl DMF für 2 h. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

2a) Für die Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)-OH wurden 5 Äquivalente von Fmoc-Lys(Boc)-OH, 5 Äquivalente 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt), 5 Äquivalente N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 5 Äquivalente N-Methylimidazol (NMI) in 750µl DMF gelöst. Diese Lösung wurde zum Harz gegeben und die Suspension für 90min geschüttelt.

2b) Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte analog dem Standardzyklus (siehe Beispiel 3).

2c) Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte analog dem Standardzyklus (siehe Beispiel 3). Die Kupplung von 24,27,30,33-Tetraoxa-12-thia-tetratricontansäure erfolgte analog den Standardvorschriften (siehe Beispiel 3) mit einer Kupplungszeit von 5 90min.

2d) Das Harz wurde dreimal mit Dichlormethan (DCM) gewaschen. Für die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde das Harz für 30min mit 750µl 50% TFA in DCM inkubiert. Anschließend wurde das Harz dreimal mit DCM und fünfmal mit DMF 10 gewaschen.

3) 6 Äquivalente der 4-Aminobenzoesäure (0,156mmol) und 6 Äquivalente (24mg, 0,156mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt) wurden in 750µl DMF gelöst und mit 6 Äquivalenten (25µl, 0,156mmol) N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt. Diese 15 Lösung wurde zum Harz gegeben und die Suspension für 90min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz zweimal mit DMF gewaschen und die Kupplung wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

20 4) Die Kupplung der Bernsteinsäure erfolgte durch Inkubation des Harzes mit 5 Äquivalenten Bernsteinsäureanhydrid und mit 5 Äquivalenten HOBt in 750µl DMF über Nacht. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

25 5) Für die Kupplung von 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan wurde zuerst das Pentafluorphenyl-Ester hergestellt. Dies erfolgte durch Inkubation des Harzes mit einer Lösung von 200µl (1,16mmol) Trifluoressigsäure-pentafluorphenylester und 100µl (1,24mmol) Pyridin in 500µl DMF für 2 h. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

30 Die Kupplung von 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan erfolgte durch Inkubation des Harzes mit einer Lösung von 500µl 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan und 50mg HOBt in 500µl DMF über Nacht. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

6) Die Amino-Gruppe von 1,13-Diamino-4,7,10-trioxatridecan wurde durch Inkubation des Harzes mit einer Lösung von 50µl Essigsäureanhydrid und 100µl Pyridin in 150µl DMF acetyliert.

5

7) Für die Abspaltung des ALK vom Harz wurde das Harz dreimal mit Ethanol gewaschen und anschließend mit 1ml 0,085M KOH in Wasser für 1 h inkubiert.

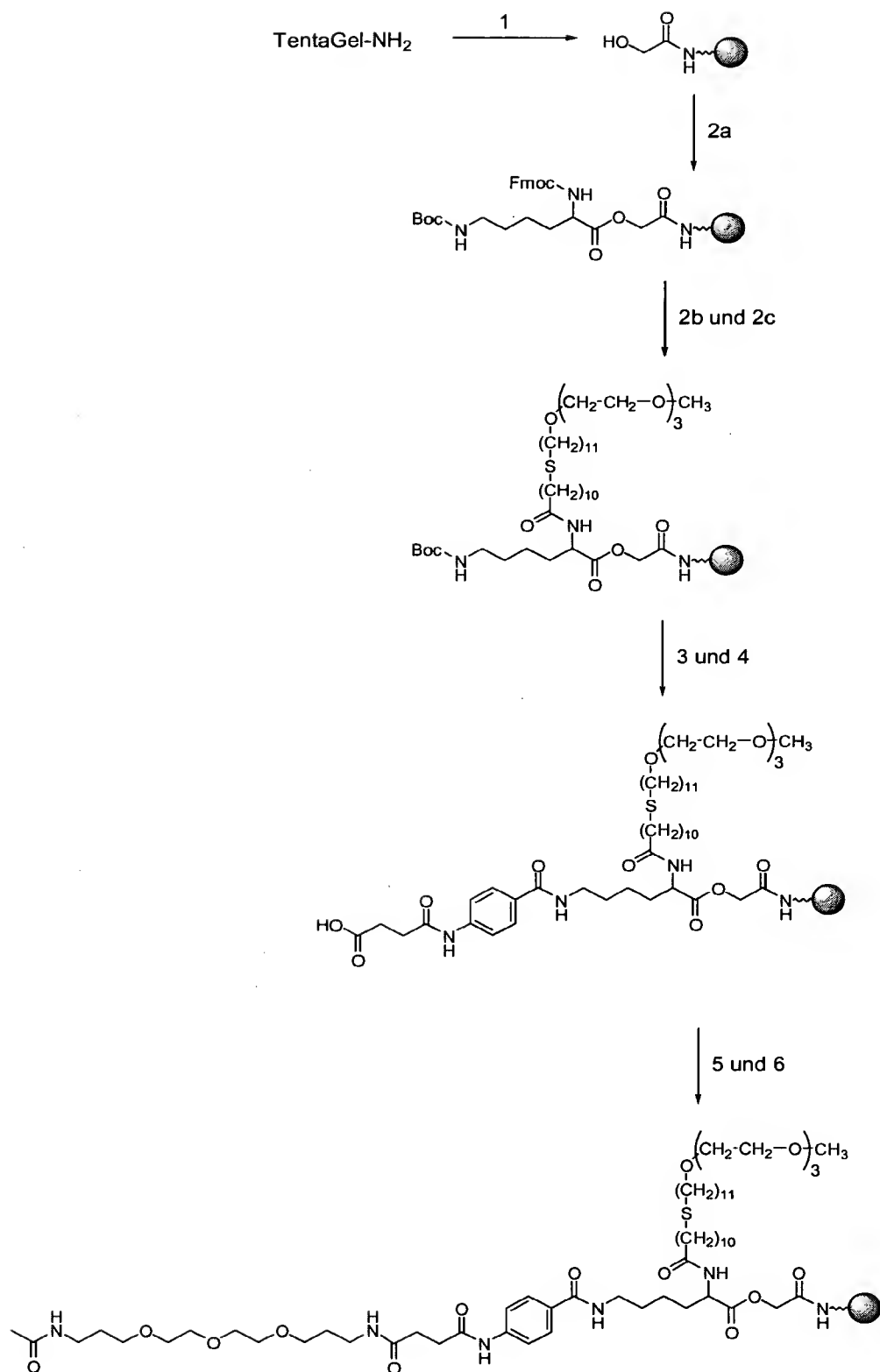
Die Lösung wurde vom Harz abgetrennt und das Harz wurde mit 850µl 0,1M HCl in Wasser gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden lyophilisiert. Das ALK wurde in

10 1/1 Wasser/Acetonitril aufgenommen und durch HPLC gereinigt.

Charakterisierung :

ESI-MS (berechnet) : $(M+2H)^{2+}$ 564,7 (564,3)

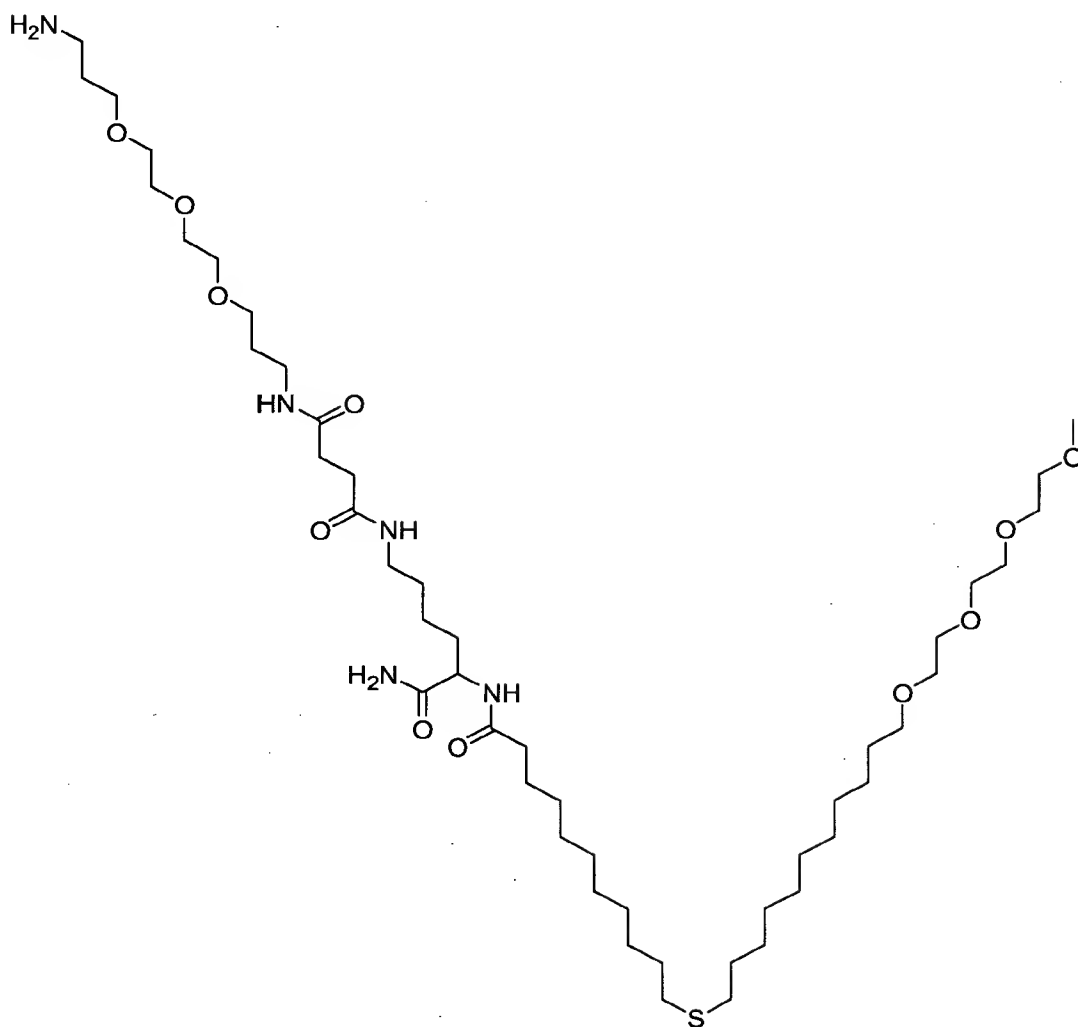
15



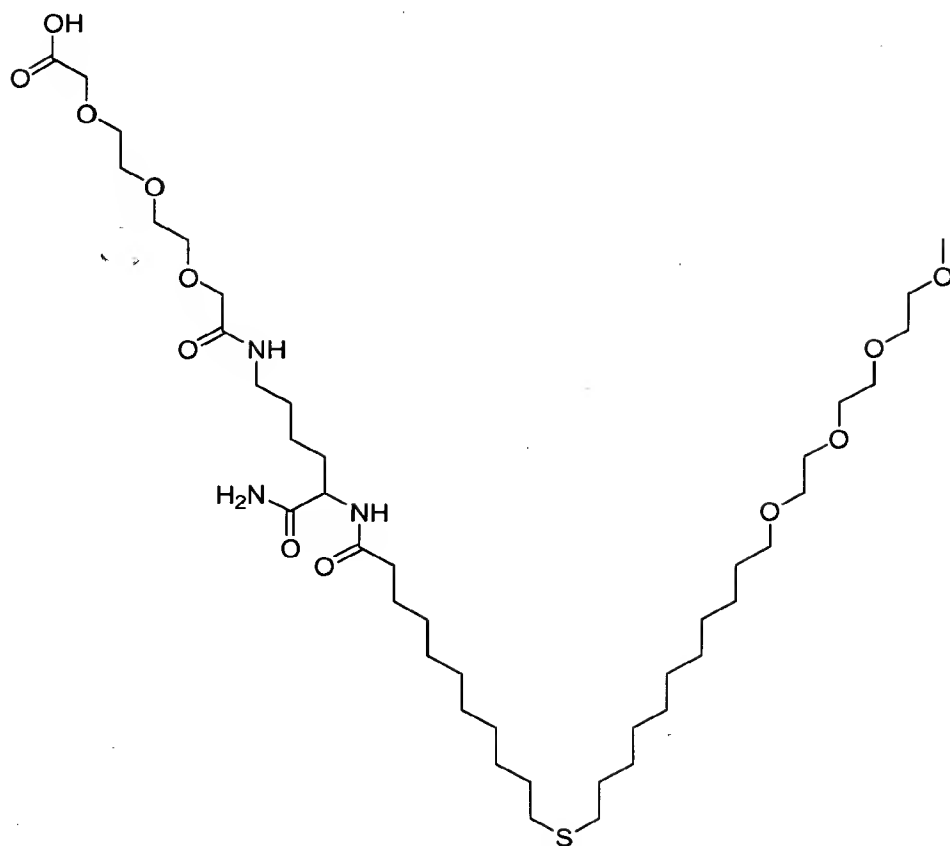
Ankerstrukturen 1-16:

Anker 1:

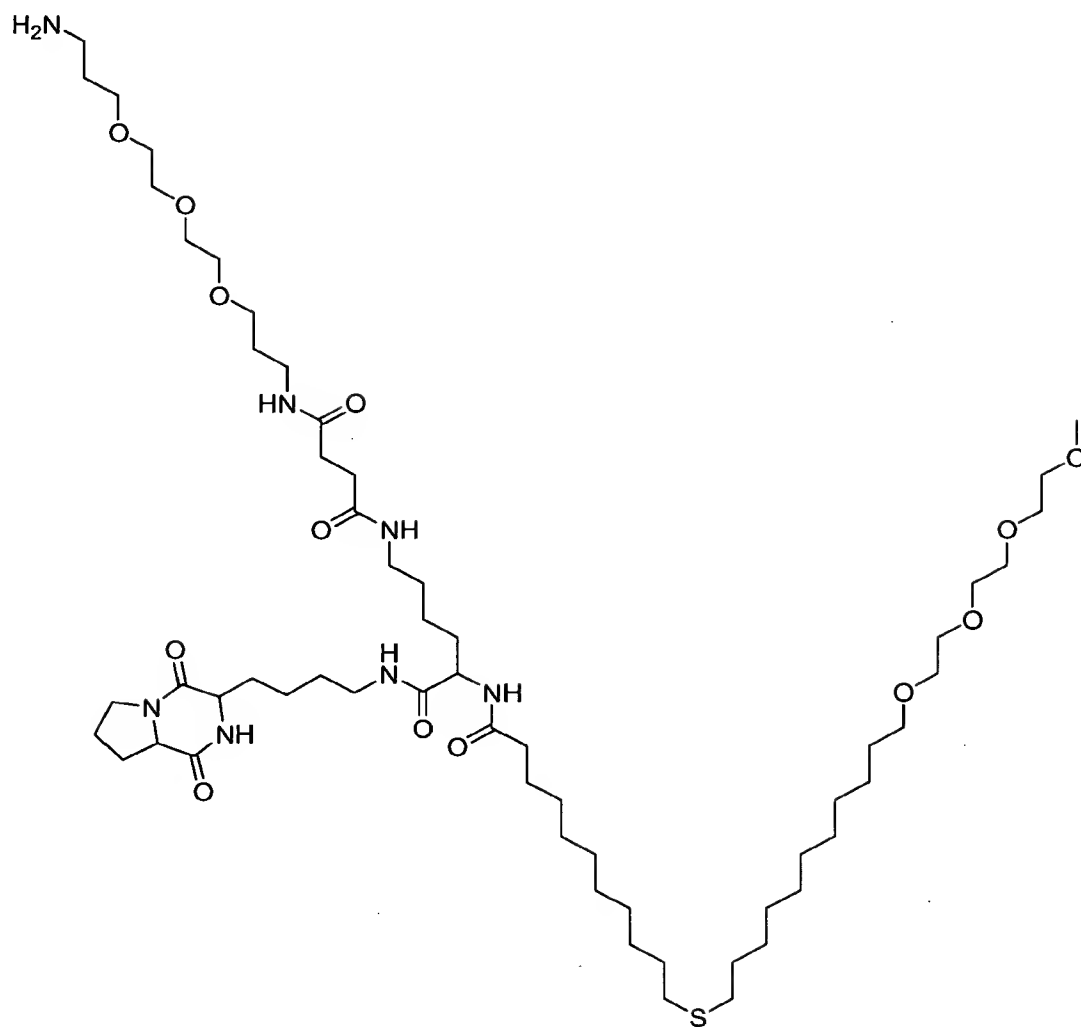
5



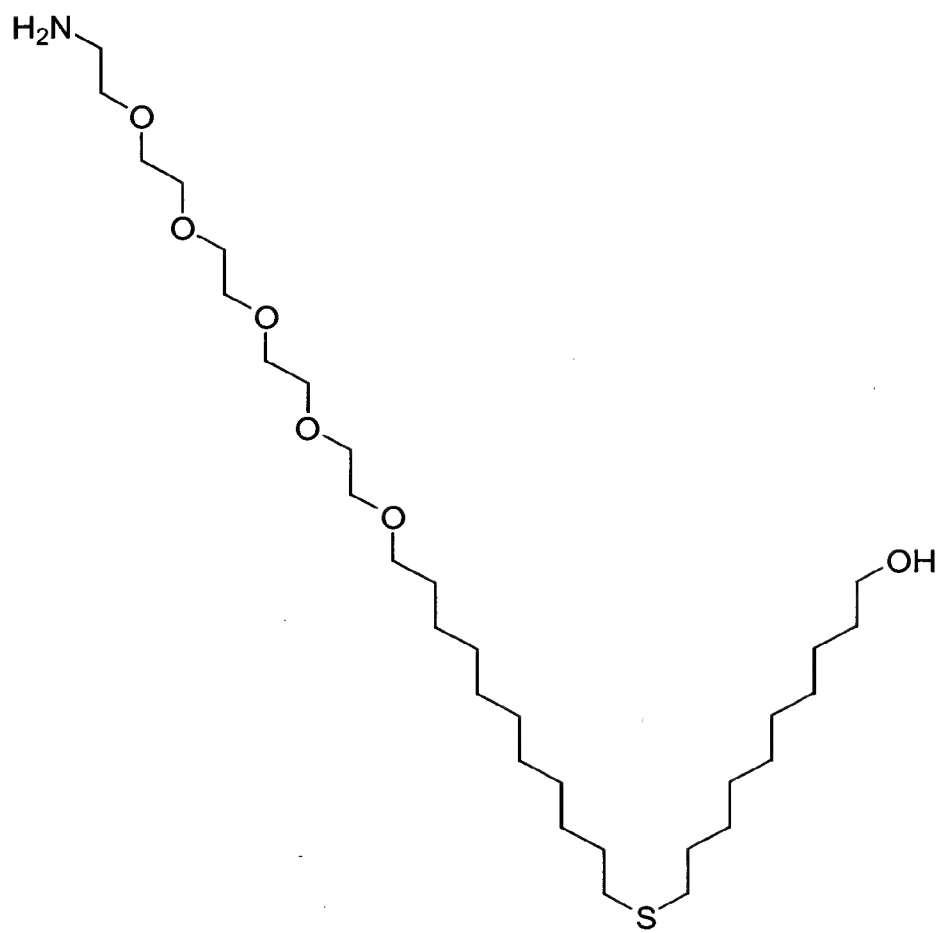
Anker 2:



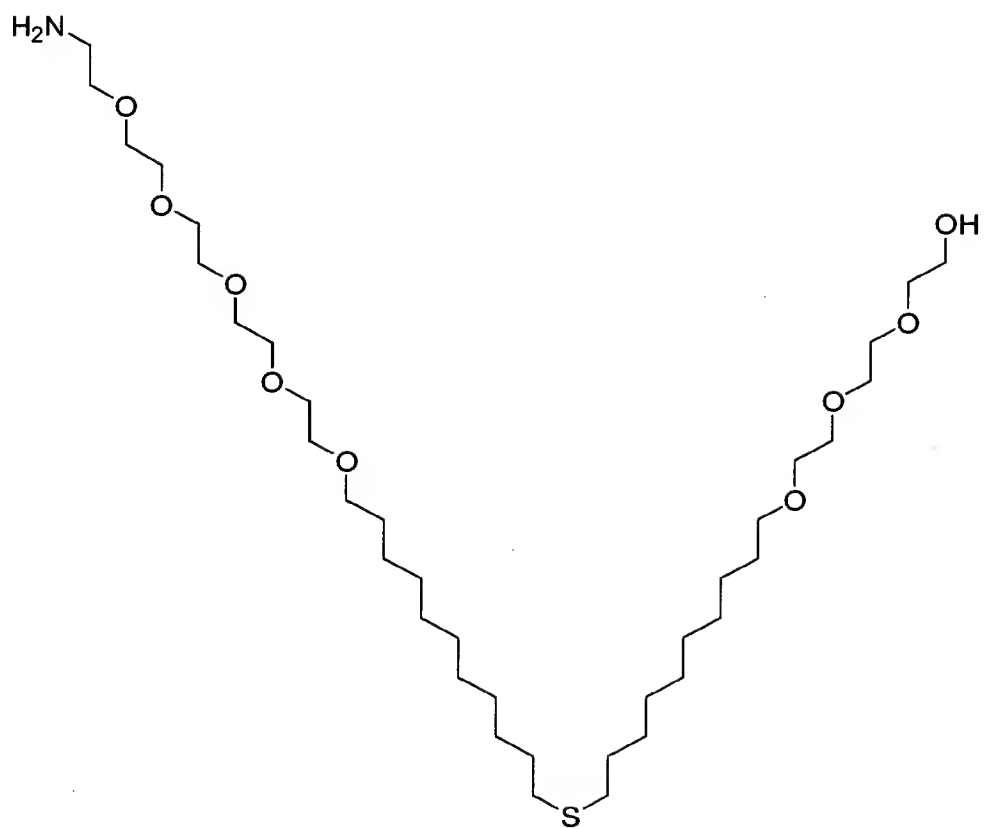
Anker 3:



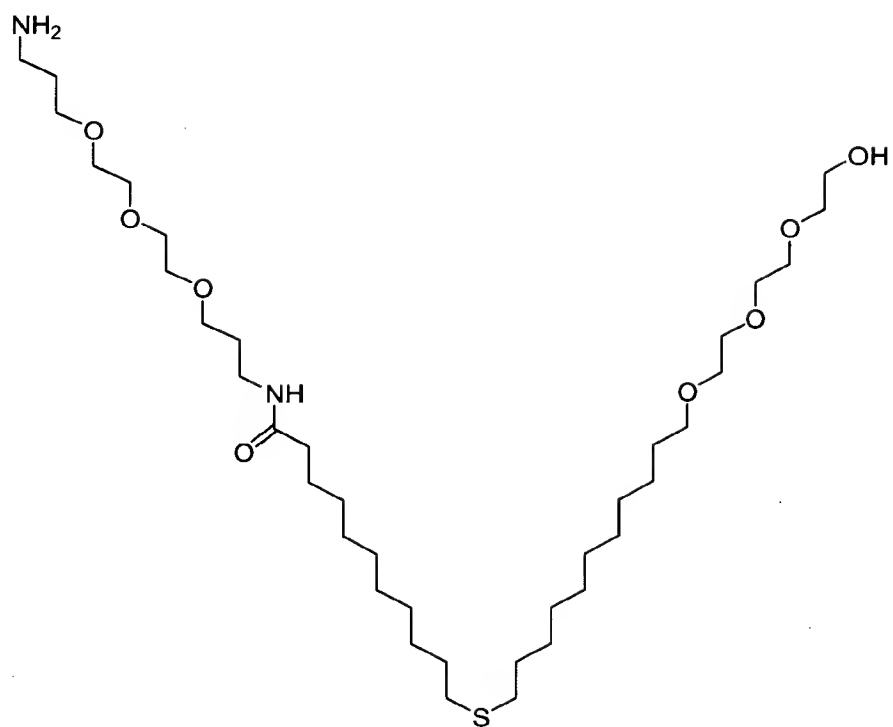
Anker 4:



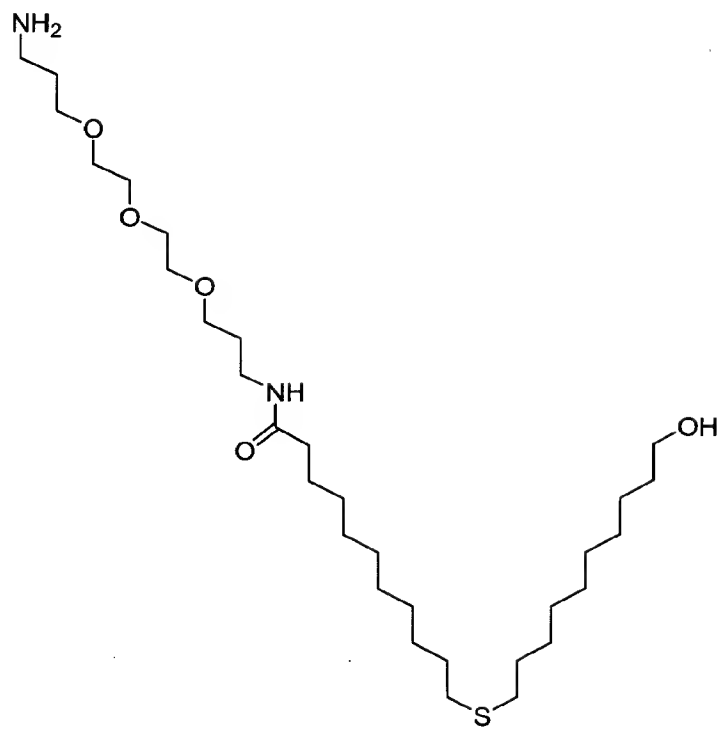
Anker 5:

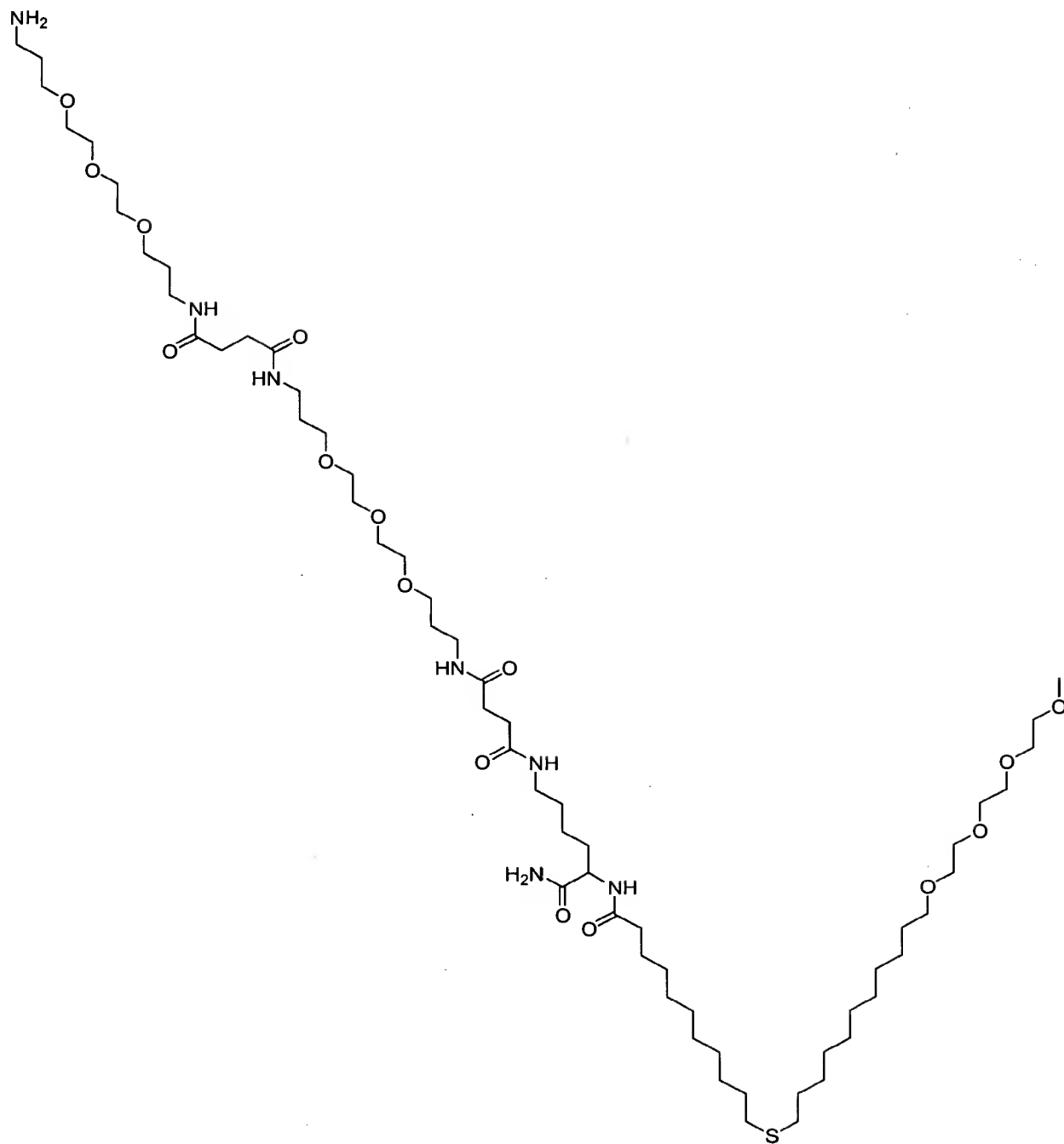


Anker 6:

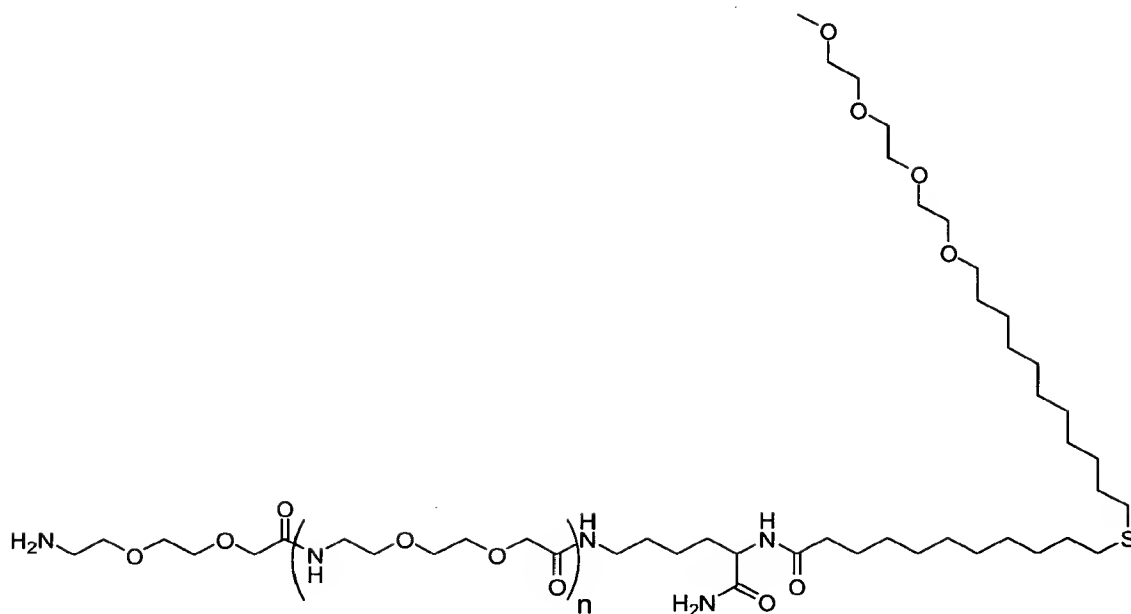


Anker 7:

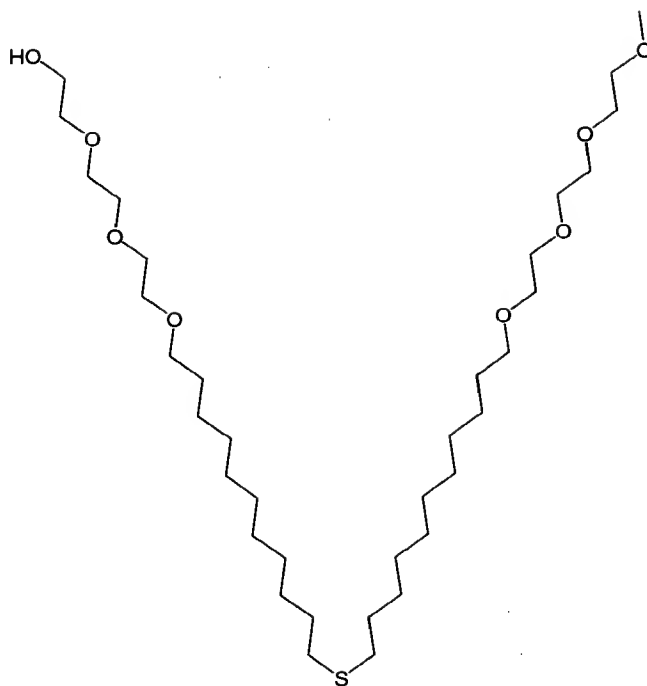


$$\text{NH}_2$$


Anker 9-4: n=5:

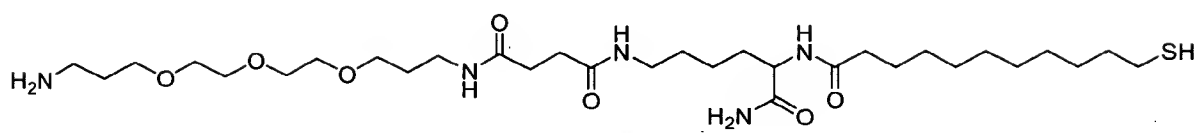


Anker 10:



Anker 11:

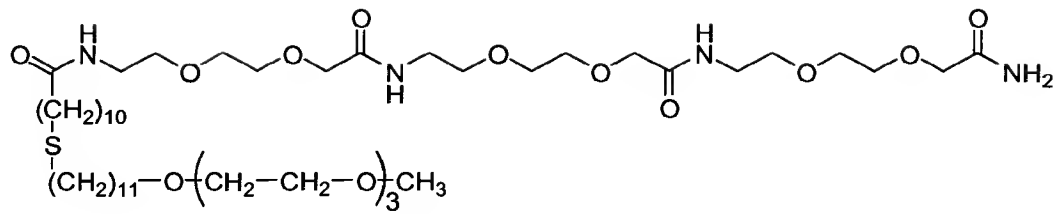
5



10

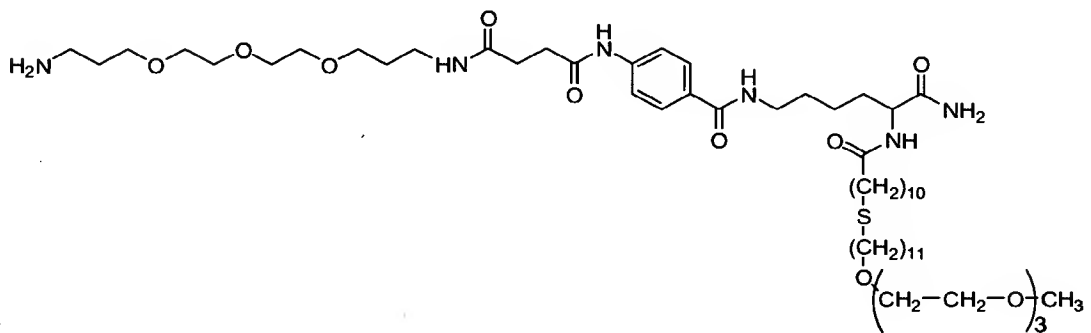
COC(=O)OCCOCCOCCOCCNC(=O)COC(=O)NCCCOC(=O)NCCCCNC(=O)C(Cc1ccc(N)cc1)c2cccc(c2)S

Anker 13:



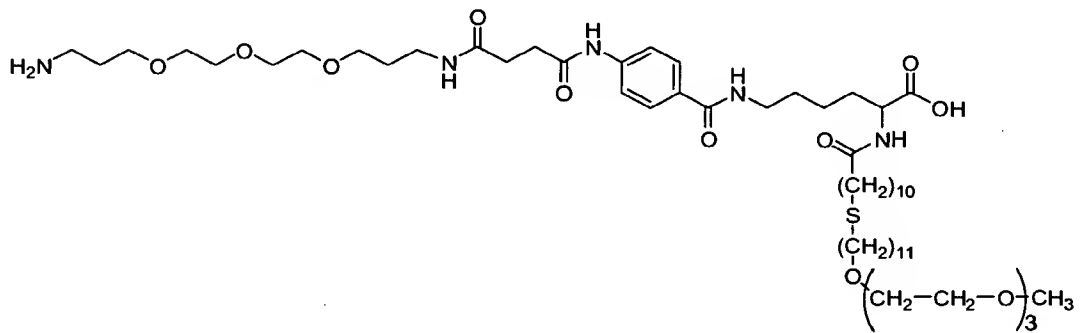
5

Anker14:



10

Anker 15:

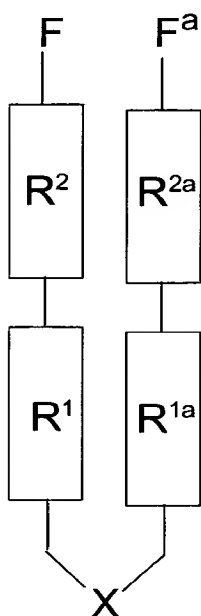


NCCCCOCCOCCOCCNC(=O)CCC(=O)NCCCCCNC(CO)C(=O)CCCCCCCCCCCCCCSCCCCCCCCCCCCCCCCC

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5 1. Ankermolekül zur Generierung einer biospezifischen Grenzschicht auf einer Oberfläche, umfassend mindestens eine Struktureinheit X, die zur Anbindung des Ankers an die Oberfläche geeignet ist, sowie mindestens eine Struktureinheit R, die die Ausbildung einer selbstassemblierten Monolage auf der Oberfläche ermöglicht und die zur Bildung einer Bindung mit einem Liganden oder einem
- 10 Nichtliganden durch eine Gruppe F terminal funktionalisiert ist.
2. Ankermolekül nach Anspruch 1, wobei R eine verzweigte oder unverzweigte, gegebenenfalls substituierte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffkette ist, die durch Heteroatome, Aromaten und heterozyklische Verbindungen
- 15 unterbrochen sein kann und 2-2000 Atome umfaßt.
3. Ankermolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei R eine hydrophobe Struktureinheit R^1 umfaßt, die von einer verzweigten oder unverzweigten Kohlenwasserstoffkette von 1 bis 50 Kohlenstoffatomen, die gesättigt oder
- 20 teilweise ungesättigt sein kann, gebildet wird.
4. Ankermolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei R einen verzweigten oder unverzweigten hydrophilen Spacer R^2 umfaßt, der durch eine mit Heteroatomen unterbrochene Kohlenwasserstoffkette von 2 bis 1000 bis
- 25 Kohlenstoffatomen gebildet wird.
5. Ankermolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Strukturelement X mindestens ein Element aus der V. oder VI. Hauptgruppe des Periodensystems umfaßt.
- 30 6. Ankermolekül nach Anspruch 5, wobei X eine Disulfid- eine Thiol- oder eine Sulfidgruppe ist.

7. Anker-molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei F eine Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylgruppe ist.
- 5 8. Anker-molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, das die folgende allgemeine Struktur aufweist



10

wobei die Reste R^1 und R^{1a} unabhängig voneinander wie R^1 in Anspruch 3 definiert sind,

die Reste R^2 und R^{2a} unabhängig voneinander wie R^2 in Anspruch 4 definiert sind,

die Gruppen F und F^a jeweils unabhängig voneinander wie F in Anspruch 7 definiert sind und

15

X wie in Anspruch 6 definiert ist,

und wobei eine oder zwei beliebige Struktureinheiten ausgewählt aus R^{1a} , R^{2a} und F^a gegebenenfalls nicht vorhanden sind oder die Kombination aus R^{1a} , R^{2a} und F^a vollständig durch ein Wasserstoffatom ersetzt sein kann.

9. Ankermolekül nach Anspruch 2, wobei R^1 und gegebenenfalls R^{1a} die Struktur –
(CH₂)_n- aufweist, wobei n eine natürliche Zahl von 1 bis 50 darstellt.
10. Ankermolekül nach Anspruch 3 oder 8, wobei R^2 und gegebenenfalls R^{2a}
5 unabhängig voneinander einen Oligoamid- und/oder Oligoetherrest darstellen.
11. Ankermolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10, zusätzlich umfassend eine
funktionelle Gruppe Y, die von der Immobilisation des Ankermoleküls an einer
festen Phase herrührt.
- 10 12. Ankermolekül nach Anspruch 12, wobei Y ein Carbonsäure-, Carbonsäureester-,
Carbonsäureamid-, Aldehyd-, Hydrazid-, Hydroxamsäure-, Hydroxy-,
Hydroxyalkyl- oder Diketopiperazylrest ist.
- 15 13. Ligand-Anker-Konjugat, umfassend ein Ankermolekül nach einem der Ansprüche
1 bis 12, das terminal mit mindestens einem Liganden verknüpft ist, der zu
spezifischen Wechselwirkungen mit einem Rezeptor fähig ist.
- 20 14. Ligand-Anker-Konjugat nach Anspruch 13, wobei der Ligand ausgewählt ist aus
Proteinen, Peptiden, Oligonukleotiden, Kohlehydraten, Isoprenoiden, Enzymen,
Lipidstrukturen, Sacchariden, Antikörpern, Peptidhormonen, Zytokinen,
Antibiotika oder organischen Molekülen mit einem Molekulargewicht ≥ 75
g/mol.
- 25 15. Ligand-Anker-Konjugat nach Anspruch 13, wobei das Ankermolekül zusätzlich
mit einem Nichtliganden verknüpft ist.
- 30 16. Biospezifische Grenzschicht auf einer Oberfläche, umfassend eine Vielzahl von
gleichen oder verschiedenen Ligand-Anker-Konjugaten nach einem oder
mehreren der Ansprüche 13 bis 15.

17. Biospezifische Grenzschicht nach Anspruch 16, zusätzlich umfassend Ankermoleküle, die ausschließlich Nichtliganden tragen.
18. Biospezifische Grenzschicht nach Anspruch 16, wobei die Oberfläche von einem Metall, einem Metalloxid oder einem Kunststoff gebildet wird.
19. Biospezifische Grenzschicht nach Anspruch 17, wobei die Oberfläche von Gold, Silber, Palladium oder Platin gebildet wird.
20. Verfahren zur Herstellung freier Ligand-Anker-Konjugate, umfassend:
- a) Immobilisation oder Synthese eines Ankermoleküls an einer für die chemische Synthese geeigneten festen Phase,
 - b) Synthese eines Liganden am Ankermolekül oder Bindung eines Liganden an das Ankermolekül und
 - c) Trennen des entstandenen Ligand-Anker-Konjugats von der festen Phase,
- wobei das Ankermolekül eine Struktureinheit aufweist, die zur Anbindung des Ligand-Anker-Konjugat an die Oberfläche geeignet ist, sowie einer Struktureinheit R, die die Ausbildung einer selbstassemblierten Monolage auf der Oberfläche ermöglicht und die zur Bildung einer Bindung mit dem Liganden terminal funktionalisiert ist, und wobei der Ligand spezifische Wechselwirkungen der Oberfläche mit einem Rezeptor ermöglichen soll.
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei eine Vielzahl unterschiedlicher Ligand-Anker-Konjugate durch Verwendung kombinatorischer Methoden bei der Synthese der Liganden erzeugt wird.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei die zur Synthese eingesetzte feste Phase ein Syntheseharz, ein Synthesepolymerfilm oder eine Silizium- oder Silikatoberfläche ist.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die feste Phase ein Syntheseharz, ausgewählt aus einem Hydroxyharz, einem Aminoharz, einem Tritylharz, einem Dihydropyranharz, einem Carboxyharz oder einem Arylsiloxyharz ist.
- 5
24. Verfahren zur Bereitstellung einer biospezifischen Grenzschicht auf einer Oberfläche, umfassend die Herstellung von Ligand-Anker-Konjugaten nach einem der Ansprüche 20 bis 23, und zusätzlich das Inkontaktbringen der erhaltenen Ligand-Anker-Konjugaten mit der Oberfläche.
- 10
25. Verfahren zur Detektion einer Wechselwirkung zwischen Liganden und Rezeptoren, umfassend das Inkontaktbringen der Rezeptoren mit einer biospezifischen Grenzschicht nach einem der Ansprüche 16 bis 19.
- 15
26. Verfahren nach Anspruch 25, zusätzlich umfassend die Messung einer Massenzunahme in der Grenzschicht mittels SPR.
- 20
27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, wobei eine Wechselwirkung der Grenzschicht mit einem oder mehreren Rezeptoren stattfindet, ausgewählt aus Proteinen, DNA, RNA, Oligonukleotiden, prosthetischen Gruppen, Vitaminen, Lipiden, Mono-, Oligo- oder Polysacchariden, oder Fusionsproteinen oder synthetisierten Primern.
- 25
28. Verwendung einer biospezifischen Grenzschicht nach einem der Ansprüche 16 bis 19 zur Interaktionsanalyse, in Screening-Verfahren oder in der Affinitätschromatographie.
- 30
29. Verwendung einer biospezifischen Grenzschicht nach einem der Ansprüche 16 bis 19 in der medizinischen Diagnostik.

ZUSAMMENFASSUNGLigand-Anker-Konjugate

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Ankermoleküle, sowie Ligand-Anker-Konjugate, die zur Bereitstellung von Meßoberflächen zur Detektion molekularer Interaktionen zwischen immobilisierten Liganden und nicht immobilisierten Interaktionspartnern (Rezeptoren) dienen. Weiterhin betrifft die Erfindung spezifische Syntheseverfahren in der Herstellung erfindungsgemäßer Ligand-Anker-Konjugate
- 10 (LAK).